



Vânia Catarina Mendes Martins Comunidade bacteriana endofítica cultivável de
Halimione portulacoides



Vânia Catarina Mendes Martins **Comunidade bacteriana endofítica cultivável de**
Halimione portulacoides

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada, especialidade em Microbiologia Clínica e Ambiental, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, Investigador Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) e Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o apoio e incentivo.

o júri

Presidente

Prof. Doutor António José Arsénia Nogueira

professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Glória Catarina Cintra da Costa Pinto

investigadora auxiliar do Departamento de Biologia e Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves

investigador auxiliar do Departamento de Biologia e Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A primeira pessoa a quem quero agradecer é ao Professor Artur Alves, por toda a ajuda e compreensão.

A todos os colegas de laboratório por terem estado sempre dispostos a ajudar em tudo o que foi necessário.

À minha família por serem sempre o meu suporte!

palavras-chave

Halimione portulacoides, endofítico, comunidade bacteriana, diversidade filogenética, potencial biotecnológico.

Resumo

Halimione portulacoides é uma planta halófita, geralmente encontrada em sapais. Tal como outras macrófitas, tem sido apontada como um bioindicador de contaminação por metais. A par com esta classificação foi considerada como potencial biomonitor para contaminação por mercúrio. A forma como esta planta interage com o sedimento, nomeadamente na mobilização de diferentes poluentes do solo, levou a que fosse considerada como potencialmente útil não só para fitoestabilização como também para fitorremediação de solos contaminados. Neste sentido, dada a potencial importância ambiental que *H. portulacoides* apresenta, o estudo de comunidades bacterianas associadas a ela é fundamental, pois além dessas comunidades desempenharem um papel funcional relevante na interacção com a planta, os estudos realizados até ao momento são limitados.

Este estudo foi realizado em 2010, centrando-se num local de colheita denominado por Largo do Laranjo, localizado na Ria de Aveiro. Neste local foram colhidas, em datas distintas, plantas da espécie *Halimione portulacoides* para posterior análise. Esta análise teve como base a divisão da planta em duas partes distintas, a raiz e a parte aérea.

A quantificação do teor de bactérias endofíticas cultiváveis revelou uma maior abundância na raiz, comparativamente à parte aérea. Os isolados obtidos foram caracterizados fisiologicamente através de diversos testes enzimáticos, apresentando resultados promissores quanto ao potencial biotecnológico, com todos os isolados a responderem positivamente a dois ou mais testes.

131 isolados foram caracterizados, destes 49 são provenientes da parte aérea e 89 da raiz. Os padrões de tipagem obtidos por ERIC-PCR permitiram o estabelecimento de 55 perfis distintos. Representantes destes perfis foram seleccionados e o rDNA 16S dos isolados foi amplificado e analisado por sequenciação. Foram identificadas bactérias pertencentes aos Filos *Actinobacteria* (predominante na parte aérea), *Firmicutes* (exclusivo da raiz) e *Proteobacteria* (predominante na raiz). Verificou-se uma maior diversidade na porção radicular, representada por 15 Géneros distintos, sendo 11 deles exclusivos deste sector. A parte aérea apresentou uma menor diversidade, com apenas 6 Géneros distintos, 2 dos quais exclusivos desta porção. No cômputo geral os Géneros mais representados foram *Pseudomonas* e *Microbacterium*.

Os resultados demonstraram que as comunidades radiculares e da parte aérea são diferentes, o que sugere não só a diferenciação da comunidade segundo o tecido, como também a possibilidade da entrada de microrganismos na planta não ocorrer apenas através da raiz.

Keywords

Halimione portulacoides, endophytic, bacterial community, phylogenetic diversity, biotechnological potential.

Abstract

Halimione portulacoides is a halophyte plant usually found in salt marshes. Like other macrophytes, has been identified as a bioindicator of metal contamination. Along with this classification this plant was considered as a potential biomonitor of mercury contamination. The way the plant interacts with the sediment, including the mobilization of different pollutants from the ground, lead to be considered as potentially useful not only for phytostabilization as well as for phytoremediation of contaminated soils. In this sense, given the potential environmental importance that *H. portulacoides* presents, the study of bacterial communities associated with it, is fundamental because besides the fact that these communities play an important functional role in the interaction with plants, studies till this moment are limited.

This study was conducted in 2010, focusing on a sampling point called Largo do Laranjo, located at Ria de Aveiro. *Halimione portulacoides* plants were harvested in this site, on different dates, for further analysis. This analysis was based on the division of the plant into two distinct parts, the root and the aerial part.

Quantifying the amount of cultivable endophytic bacteria revealed a greater abundance in the root compared with the aerial part. The isolates were characterized physiologically by several enzymatic tests, showing promising results regarding the biotechnological potential, with all isolates responding positively to two or more tests.

131 isolates were characterized, 49 of these are from the aerial part and 89 from the root. The typing patterns obtained by ERIC-PCR enabled the identification of 55 distinct profiles. Representatives of these profiles were selected and the 16S rDNA of the isolates was amplified and analyzed by sequencing. Bacteria belonging to phyla *Actinobacteriea* (predominantly in the aerial part), *Firmicutes* (exclusive of root) and *Proteobacteria* (predominantly in the root) were identified. There was a greater diversity in the root portion, represented by 15 distinct genera, 11 of them unique to this sector. The aerial part had a lower diversity, with only 6 different genera, 2 of which are unique in this part.

Overall the most represented genera were *Pseudomonas* and *Microbacterium*. The results showed that communities of the root and from the aerial part are different, which suggests not only the differentiation of the community according to the tissue, but also the possibility that the root is not the only existent entry of microorganisms in the plant.

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Lista de abreviaturas	v
1.Introdução	1
1.Microrganismos endofíticos	2
2. <i>Halimione portulacoides</i>	6
2.1Caracterização da planta	6
2.2Importância	7
3.Objectivos	10
2. Material e Métodos	11
1.Preparação dos extratos	12
1.1Local de Colheita	12
1.2Procedimento de colheita	13
1.3Tratamento das amostras	13
1.3.1Esterilização	13
1.3.2Sementeira	14
2.Meios de Cultura	14
2.1Meio de cultura	14
2.2Meios para detecção de actividades enzimática extracelulares	15
3.Conservação dos microrganismos	16
4.Reagentes	16
4.1Composição de soluções de uso geral	16
4.2Enzimas para extracção de ácidos nucleicos	17
5.Marcadores de peso molecular para DNA	17
6.Extracção de DNA das bactérias isoladas	18
7.Amplificação de fragmentos de DNA por PCR	18
8.Electroforese de DNA	19
8.1Electroforese em gel de agarose convencional	19

8.2 Visualização do DNA	20
9. Amplificação da região 16S rDNA	20
10. Purificação dos produtos de Amplificação	21
11. Determinação da Sequência nucleotídica	22
12. Caracterização fisiológica	22
12.1 Actividade amilolítica	22
12.2 Actividade proteolítica	23
12.3 Actividade lipolítica	23
12.4 Actividade de celulase	23
12.5 Actividade da xilanase	24
12.6 Actividade pectinolítica	24
13. Análise computacional	25
3. Resultados e discussão	27
1. Teor de Bactérias endofíticas cultiváveis	28
2. Caracterização fisiológica	30
3. Diversidade Filogenética	35
3.1 Estrutura geral da comunidade endofítica	35
3.2 Identificação dos isolados bacterianos	40
4. Árvores filogenéticas	52
5. Conclusão	56
6. Perspectivas futuras	56
4. Bibliografia	59
Anexos	67

Lista de Figuras

Figura II.1: Fotografia de satélite do local de colheita, Largo do Laranjo, Ria de Aveiro, Portugal.

Figura III.1: Resultado dos testes de determinação de actividade celulolítica.

Figura III.2: Resultado dos testes de determinação de actividade amilolítica.

Figura III.3: Resultado dos testes de determinação de actividade proteolítica.

Figura III.4: Resultado dos testes de determinação de actividade lipolítica.

Figura III.5: Exemplos de padrões de fingerprinting obtido por ERIC-PCR, realizado segundo o procedimento explanado na secção Materiais e Métodos.

Figura III.6: Dendrograma representativo da similaridade genética dos isolados analisados.

Figura III.7: Proporção de grupos taxonómicos (Filos) representados pelos isolados endofíticos de *Halimione portulacoides* numa análise global (Total) e nas secções Raíz (RZ) e Parte Aérea (PA).

Figura III.8: Proporção de grupos taxonómicos (Classes) representados pelos isolados endofíticos de *Halimione portulacoides* numa análise global (Total) e nas secções Raíz (RZ) e Parte Aérea (PA).

Figura III.9: Proporção de grupos taxonómicos (Géneros) representados pelos isolados endofíticos de *Halimione portulacoides* numa análise global (Total) e nas secções Raíz (RZ) e Parte Aérea (PA).

Figura III. 10: Árvore filogenética baseada nas sequências de rDNA, mostrando as relações entre todos os isolados do Filo Actinobacteria analisados.

Figura III. 11: Árvore filogenética baseada nas sequências de rDNA, mostrando as relações entre todos os isolados do Filo Firmicutes analisados.

Figura III. 12: Árvore filogenética baseada nas sequências de rDNA, mostrando as relações entre todos os isolados do Filo Proteobacteria analisados.

Lista de Tabelas

Tabela I.1. Produtos naturais derivados ou produzidos por diversos microrganismos endofíticos (adaptado de Ryan et al. 2008).

Tabela III.1: Valores médios de contagens totais de bactérias endofíticas de *H. portulacoides* por réplica (três réplicas por diluição), expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Tabela III.2: Quantificação de teor de bactérias endofíticas de *H. portulacoides* por grama de tecido. Os resultados estão expressos em UFC/g.

Tabela III.3: Enzimas extracelulares produzidas em cultura pelos isolados.

Tabela III.4: Filiação filogenética das sequências bacterianas do gene 16S rRNA obtidas da comunidade endofítica de *Halimione portulacoides*, Parte Aérea e Raiz.

Tabela V.1: Listagem dos primers utilizados neste trabalho.

Lista de Abreviaturas

µg	Micrograma
µL	microlitro
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	pares de bases
CIA	Clorofórmio e álcool isoamílico
CTAB	Brometo de Cetrimónio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleótidos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
EtBr	Brometo de Etídio
g	grama
h	hora
HCl	Ácido clorídrico
IRS	indução de resistência sistémica
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	di-hidrogeno fosfato de potássio
L	litro
M	Molar
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
Na ₂ HPO ₄	di-sódio hidrogeno fosfato
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
PA	Parte aérea
PBS	Tampão fosfato-salino

PCR	Polimerase chain reaction
RNA	Acido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
RSA	resistência sistêmica adquirida
RZ	Raíz
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBT	tributil-estanho
TE	Tris-HCl
TSA	Trypticase Soy agar
TSB	Trypticase Soy Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
ZPE	Zona de Protecção Especial

1. Microrganismos endofíticos

A teoria de que bactérias não patogénicas residem em tecidos de plantas foi formulada por Perotti em 1926. Contudo, estudos sobre a colonização de tecidos internos de plantas saudáveis por bactérias datam de 1870, com os trabalhos de Pasteur e outros investigadores. Inicialmente as bactérias endofíticas foram consideradas como contaminantes resultantes de desinfecção superficial incompleta ou como patogénios fracamente virulentos (Baretti et al., 2008).

A definição de endofítico evoluiu e alterou-se ao longo dos anos. A definição mais precisa é “fungo ou bactéria, que durante parte ou todo o seu ciclo de vida, invade os tecidos de plantas vivas causando infecção inaparente e assintomática inteiramente em tecidos da planta, sem causar sintomas de doença” (Conn et al., 2004). Os endofíticos diferem, assim, dos epifíticos que vivem na superfície das plantas e dos fitopatogénicos que lhes causam doenças.

Até ao momento foram encontrados microrganismos endofíticos em praticamente todas as espécies estudadas (Ryan et al, 2008), o que sugere uma relação entre planta e endofítico, evidenciando uma co-evolução dos microrganismos com o seu hospedeiro. Esta relação mutualista entre planta e microrganismo permite ao endofítico receber nutrientes e protecção da planta hospedeira (Pinto, 2003).

A interacção planta-endofítico bacteriano melhor estudada é a simbiose leguminosa-*Rhizobium*. *Rhizobium* são bactérias do solo que podem formar uma simbiose com leguminosas produzindo nódulos nos quais ocorre a fixação de azoto. Esta simbiose tem sido importante para a agricultura, uma vez que culturas de leguminosas têm sido plantadas de forma rotativa para aumentar a produtividade de culturas não leguminosas (Conn et al, 2004).

Bactérias endofíticas foram isoladas de diversos tipos de plantas, incluindo tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Barretti et al, 2008), batata (*Solanum tuberosum* L.) (Andreote et al, 2009), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Zinniel et al, 2001), milho (*Zea mays* L.) (Seghers et al, 2003), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (Misaghi e Donndelinger, 1990), colza (*Brassica napus* L.) (Granér et al, 2003), arroz selvagem (*Oryza officinalis* L.) (Elbeltagy et al, 2001), soja (*Glycine max* L.) (Assumpção et al, 2009) e citrinos (Lacava et al, 2006). Os microrganismos endofíticos só recentemente têm despertado o interesse da comunidade científica especialmente pelo seu potencial na produção de metabolitos de interesse económico.

O conhecimento acerca das interacções planta/endofítico não está ainda muito aprofundado, contudo considera-se que estas interacções podem ser de três tipos: simbióticas, neutras ou antagónicas (sendo as últimas estudadas pela fitopatologia) (Souza et al, 2004). Geralmente, os endofíticos estabelecem associações neutras com plantas, podendo, com o passar do tempo, ajudar no seu desenvolvimento, proporcionando assim, uma associação benéfica através da sua presença em raízes, caules e folhas.

Nas interacções simbióticas, os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabolitos primários e secundários que poderão proporcionar diversas vantagens à planta nomeadamente a diminuição da herbivoria e do ataque de insectos, o aumento da tolerância a stress abiótico e o controle de outros microrganismos (Souza et al, 2004). Os microrganismos endofíticos tornam-se assim potencialmente úteis não só na agricultura, como já referido, mas também na indústria, particularmente a farmacêutica e a alimentar. Podem ser utilizados como vectores para a introdução de genes de interesse nas plantas, como agentes inibidores de pragas e patógenos e como fontes de metabolitos primários e secundários de interesse (Souza et al, 2004). Os metabolitos produzidos podem ser variados, incluindo enzimas, aminoácidos, vitaminas, antibióticos, pigmentos, agentes moduladores de resposta imunitária, toxinas, agentes anti-tumorais, factores de crescimento de plantas, anti-helmínticos e anti-micóticos (Souza et al, 2004). Na realidade, as bactérias endofíticas colonizam um nicho semelhante ao dos fitopatogénicos, o que as torna adequadas para controlo biológico. Diversos estudos concluíram que os microrganismos endofíticos têm a capacidade de controlar os patógenos das plantas, nomeadamente insectos, nemátodes e fungos (Ryan et al, 2008). Considera-se que algumas bactérias endofíticas despoletam um fenómeno conhecido como indução de resistência

sistémica (IRS), fenotipicamente semelhante à resistência sistémica adquirida (RSA). Estes tipos de resistência diferem na medida em que IRS é efectiva contra diversos tipos de patógenos, mas, contrariamente à SAR, as bactérias induzidas não causam sintomas visíveis na planta (Ryan et al, 2008).

Bactérias endofíticas demonstraram trazer às plantas diversos benefícios, nomeadamente o controlo de infecções fúngicas, aumento da fixação de azoto e aceleração da emergência da semente, bem como melhoramento da germinação, comprimento das plântulas e crescimento da planta, promovendo o estabelecimento da planta em condições adversas (Conn et al, 2004).

A par com a produção de diversos compostos já referidos, alguns endofíticos demonstraram uma capacidade natural para degradação xenobiótica ou podem actuar como vectores para introdução de características de degradação. Taghavi et al (2005) comprovaram que poderia ocorrer transferência horizontal de genes no seio da comunidade endofítica, o que poderá permitir a utilização de estirpes não específicas para o desenvolvimento de novas características nas comunidades endofíticas. A capacidade de alguns endofíticos para resistirem a metais e degradar compostos orgânicos provavelmente decorre da sua exposição a diversos compostos no nicho planta-solo (Ryan et al., 2008).

A comunidade endofítica é significativamente diferente consoante o solo em que ocorre o crescimento da planta. Considera-se, por isso, que esta comunidade é um subgrupo da existente na rizosfera. A população endofítica é menos diversa e parece ter origem na rizosfera. Assim, plantas que crescem em solos que comportam maior número de microrganismos, deverão apresentar um maior e mais diverso número de endofíticos (Conn et al., 2004).

Do mesmo modo que os patogénicos, os endofíticos apresentam capacidade de penetrar nos tecidos da planta e de disseminar sistemicamente, habitando de forma activa o apoplasto do hospedeiro. A disseminação poderá ocorrer de diferentes modos, sendo o mais comum a entrada através de feridas e aberturas naturais da raiz (Pinto, 2003).

Tal como descrito por Azevedo (1998) a disseminação poderá ocorrer durante o crescimento da raiz (ao penetrar no solo, este órgão da planta sofre abrasões que facilitam a entrada dos microrganismos), através de aberturas naturais como os estomas e hidátodos ou pelas aberturas causadas por outros organismos, como insectos ou por estruturas de fungos patogénicos.

Muitos endofíticos são membros de géneros comuns no solo como *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus* (Ryan et al, 2008). Estes géneros são conhecidos pela sua diversa gama de metabolitos secundários incluindo antibióticos, compostos anticancerígenos, compostos orgânicos voláteis, antifúngicos, antivirais, insecticidas e agentes imunossupressores. Alguns estudos fazem ainda referência a microrganismos pertencentes a outros géneros como *Pantoea* e *Microbacterium* (Mendes et al, 2007). Estes microrganismos demonstraram promover o crescimento de diferentes culturas sendo capazes de controlar doenças específicas da planta (Mendes et al, 2007).

Ainda que a maioria das pesquisas se centre na produção de compostos antimicrobianos baseada em fungos, uma variedade de produtos de baixo peso molecular, activos a baixas concentrações contra uma gama de bactérias patogénicas para humanos, animais e plantas, têm sido isolados de endofíticos bacterianos (tabela I.1).

Tabela I.1. Produtos naturais derivados ou produzidos por diversos microrganismos endofíticos (adaptado de Ryan et al. 2008).

Organismo	Planta Associada	Agente activo	Actividade	Referencia
<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	Taxol	Anticancerígeno	Strobel et al. (1993)
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Relva	Ecomicinas B e C	Antimicrobianos	Miller et al. (1998)
<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Kandelia candel</i>	Ácidos p-aminofenólicos	Antimicrobianos	Guan et al. (2005)
<i>Streptomyces</i> NRRL 30562	<i>Kennedia nigriscans</i>	Munumbicinas	Antimalárico	Castillo et al. (2002)
<i>Streptomyces</i> NRRL 30566	<i>Grevillea pteridifolia</i>	Kakadumicinas	Antibiótico	Castillo et al. (2003)
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Rhyncholacis penicillata</i>	Oocidina A	Antifúngico	Strobel et al. (2004)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Trigo Feijão verde <i>Arabidopsis thaliana</i> Colza	Fusaricidina A-D	Antifúngico	Beck et al. (2003) Beatty e Jensen (2002)
<i>Cytospora</i> sp.	<i>Quercus</i> sp. 103	Ácidos Cítonicos A e D	Antivirico	Guo et al. (2000)
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Monstera</i> sp.	Coronamicina	Antifúngicos antimaláricos	Ezra et al. (2004)
<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	<i>Tripterigeum willfordii</i>	Criptocandina	Antifúngico	Strobel et al (1999)

Um membro do grupo de pseudomonas fluorescentes associadas a plantas, *Pseudomonas viridiflava*, isolada dos tecidos de diferentes espécies de relva, demonstrou produzir dois novos compostos antimicrobianos denominados por ecomicinas. As ecomicinas

representam uma nova família de lipopéptidos e são constituídas por alguns aminoácidos não usuais incluindo homoserina e ácido β -hidroxiaspártico (Miller et al, 1998). Concluiu-se que estes compostos são capazes de inibir os patógenos humanos *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (Miller et al, 1998). Foram ainda isolados inibidores virais tais como ácidos citónicos A e D produzidos por *Cytospora* sp. a partir de fermentação em estado sólido, que provaram inibir o citomegalovirus humano (Guo et al, 2000).

2. *Halimione portulacoides*

2.1 Caracterização da planta

A vegetação dos sapais é relativamente pobre em relação à diversidade florística, apresentando geralmente grandes áreas cobertas quase exclusivamente por apenas uma espécie. Os sapais apresentam uma baixa diversidade de géneros e espécies com características fisiológicas e morfológicas que lhes permitem estarem bem adaptadas a este habitat (Adam, 1993). Ainda que esta não seja uma definição consensual, as plantas halófitas podem ser definidas como aquelas que se encontram adaptadas para concluir o seu ciclo de vida em habitats com valores de salinidade próximos da água do mar ou mesmo superiores. Estas plantas estão adaptadas morfológicamente e fisiologicamente a crescer em solos ricos em sal ou em ambientes com atmosferas carregadas de sal. Estas adaptações permitem a prevenção dos efeitos do NaCl na planta, nomeadamente da inibição da actividade enzimática por contacto com este sal e a diminuição das diferenças no potencial osmótico durante a inundação da maré (Silva, 2000).

As plantas classificadas como halófitas são encontradas em habitats marinhos, sapais, mangais da zona tropical e desertos salinos.

As halófitas apresentam uma morfologia semelhante à das xerófitas, com caules ou folhas suculentos e redução das folhas (Silva, 2000).

As Chenopodiaceae, família a que pertence a espécie alvo do presente estudo, apresentam uma maior percentagem de géneros halofíticos e um maior número de espécies. Esta família é uma das mais representativas do sapal médio e alto não só pelo número de espécies como pela percentagem de cobertura do sedimento.

Halimione portulacoides caracteriza-se como um caméfito lenhoso, podendo atingir até 1,5m de altura. É uma espécie monóica, protrado-ascendente, com coloração prateado-farinoso, de caules frequentemente radicantes. As folhas são decussadas, lanceoladas e abovadas, inteiras e carnudas. A inflorescência apresenta flores unissexuais e o fruto é séssil.

Relativamente à sua distribuição, encontra-se disperso pela costa da Península Ibérica, nomeadamente no Algarve, Beira Litoral e Estremadura, podendo ainda ser encontrada nas costas do Mediterrâneo, do Atlântico europeu e norte-americano e da África Austral (Silva, 2000).

2.2 Importância

Até ao momento, a grande maioria dos estudos efectuados para identificação e caracterização de comunidades endofíticas tiveram como objecto de estudo, plantas com importância alimentar, económica ou medicinal. *Halimione portulacoides*, tal como já descrito anteriormente é uma planta halófita, encontrada geralmente em sapais. O seu consumo ainda que seja possível (sobretudo em saladas) não está generalizado, pelo que não será correcto afirmar que esta planta assume um papel relevante na dieta alimentar da população em geral. Mesmo em termos económicos e medicinais não existem aplicações conhecidas com recurso a esta planta. No entanto, existem diversos estudos que comprovam a importância que esta planta poderá ter a nível ambiental.

Macrófitas aquáticas têm sido sugeridas como bioindicadores de contaminações por metais em regiões costeiras e *H. portulacoides* em particular foi considerada por Válega et al (2008) como um potencial biomonitor para contaminação por mercúrio. Bioindicador é um organismo, parte de um organismo ou conjunto de organismos que permite a obtenção de informação acerca da qualidade de um ambiente (informação qualitativa) e biomonitor é um organismo (parte de um organismo ou um conjunto de organismos) que quantifica a qualidade do ambiente em que se encontra (informação quantitativa). A utilização de biomonitores tem vindo a aumentar nos últimos anos, mostrando-se uma ferramenta promissora para a identificação de potenciais riscos para a saúde humana e para providenciar novas abordagens para a avaliação de qualidade ambiental. Os biomonitores têm ainda sido considerados como ferramentas que permitem o acesso a dados geográficos

e temporais acerca das variações da fracção biodisponível dos contaminantes do ecossistema. Esta fracção é a que apresenta maior relevância toxicológica do ponto de vista ecológico. (Válega et al, 2008).

Para ser considerado como um bom biomonitor, o organismo deverá obedecer a determinadas características, tais como ter uma ampla distribuição geográfica; permitir uma identificação simples; não ser sazonal de forma a permitir uma amostragem ao longo do ano; ter uma vida longa; ter dimensões suficientemente grandes para permitir a análise individual; ser resistente ao stress causado pela manipulação; ser tolerante à exposição às variações ambientais de parâmetros físico-químicos como a salinidade; acumular contaminantes nos tecidos numa correlação directa com a concentração do poluente biodisponível no ambiente (Rainbow, 1995).

Quando os metais contaminantes entram no sapal, distribuem-se pelos sedimentos e água intersticial. Os metais incorporados nos sedimentos podem ser absorvidos pela vegetação e acumulados nos tecidos das plantas, principalmente durante o período de crescimento. Contudo, as interações raiz-sedimento são bastante complexas, e a absorção de metais pelas plantas halófitas depende da sua mobilidade e disponibilidade nos sedimentos, que é determinada por características físicas e químicas como o pH, salinidade, potencial redox, quantidade de matéria orgânica e tamanho do grão do sedimento (Castro et al, 2009).

Diversos estudos referem que a actividade radicular pode alterar física e quimicamente as características dos sedimentos, influenciando o fraccionamento geoquímico dos metais e assim a sua disponibilidade para as plantas (Reboreda e Caçador, 2007). Áreas com uma maior cobertura vegetal apresentam concentrações mais elevadas de metais nos sedimentos comparativamente a áreas sem vegetação (Caçador et al, 1996). Sedimentos anóxicos na zona das raízes podem ser oxidados pela movimentação de oxigénio através do aerênquima. Este processo varia entre espécies, sendo influenciado pelo tamanho e morfologia dos sistema radicular, permite a mobilização de metais contaminantes, aumentando assim a disponibilidade dos metais que de outra forma seria baixa (Castro et al, 2009).

As plantas de sapal geralmente acumulam diferentes percentagens de metais entre os órgãos superiores e inferiores, ocorrendo uma maior retenção nas raízes. Os metais podem induzir perturbações da actividade metabólica severas, inactivando proteínas estruturais e enzimas metabólicas. De forma a evitar esses efeitos nefastos, algumas plantas

desenvolveram diversos mecanismos de tolerância, nomeadamente mecanismos que impedem a entrada de metais na planta, como a inibição da absorção de metais do solo e restrição da passagem de metais para os rebentos. Uma vez acumulados nos tecidos da parte aérea, os seus efeitos podem ser reduzidos quer pela imobilização na parede celular, quer pela quelação com péptidos específicos ou ácidos orgânicos (Castro et al, 2009).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de conhecer a interacção de *Halimione portulacoides* com diferentes poluentes no solo (Reboreda e Caçador, 2007), nomeadamente contaminantes como metais pesados.

Sabe-se que os sedimentos entre as raízes de *Spartina maritima* concentram uma maior quantidade de metais comparativamente aos sedimentos entre as raízes de *H. portulacoides*. Esta razão inverte-se quando analisados os tecidos da planta, pois *H. portulacoides* apresenta uma concentração de metais nos seu tecidos superior à apresentada por *S. maritima* (Reboreda e Caçador, 2007).

Estas diferenças são importantes para a fitoestabilização de metais em áreas poluídas, uma vez que estas plantas têm capacidade para induzir concentrações de metais nos sedimentos das raízes e evitar a translocação para os tecidos da parte aérea da planta, contribuindo mais efectivamente para a imobilização de metais poluentes (Reboreda e Caçador, 2007). Metais contidos nas partes aéreas das plantas são mais susceptíveis de voltar ao sistema através de excreção pelas folhas ou decomposição dos resíduos da planta, podendo actuar como uma fonte de metais para o sistema. Reboreda e Caçador (2007) concluíram que a utilização de *H. portulacoides* para fitorremediação de sapais poluídos poderá ser aplicada segundo duas perspectivas distintas: a fitoestabilização dos metais nos rizossedimentos, ou a fitoextração por acumulação nos tecidos das partes aéreas da planta seguida de remoção da planta.

Carvalho et al. (2010), referem a importância que as plantas comumente encontradas em ecossistemas de sapal, como *H. portulacoides* poderão ter na remediação de solos poluídos por tributil-estanho (TBT). Segundo estes, os sedimentos colonizados por *H. portulacoides* apresentaram níveis de TBT cerca de 30% abaixo do que os solos sem vegetação com composição inicial idêntica. *Halimione portulacoides* demonstrou ainda capacidade para estimular o crescimento bacteriano na rizosfera da planta (Carvalho et al, 2010).

Interacções mútuas entre uma determinada planta e o ambiente químico que a envolve (rizosfera) podem condicionar o papel da planta juntamente com os microrganismos da rizosfera na distribuição, degradação e absorção da poluição (Carvalho et al, 2010).

3. Objectivos

Com o presente trabalho pretende-se contribuir para o desenvolvimento do conhecimento acerca das comunidades endofíticas, nomeadamente através do estudo da comunidade bacteriana cultivável de *Halimione portulacoides*. Até ao momento, poucos foram os estudos que tiveram como finalidade a identificação e caracterização das comunidades bacterianas endofíticas associadas a plantas de sapal. Os estudos já realizados prendem-se sobretudo com a caracterização das comunidades associadas aos sedimentos deste habitat ou à rizosfera de algumas plantas de sapal como *Halimione portulacoides*.

No sentido de colmatar esta falha, foi desenvolvido o presente trabalho, tendo-se estabelecido como principais objectivos a caracterização da comunidade endofítica de *Halimione portulacoides* e o estudo do seu potencial biotecnológico.

2. Material e Métodos

1. Preparação dos estratos

1.1. Local de colheita

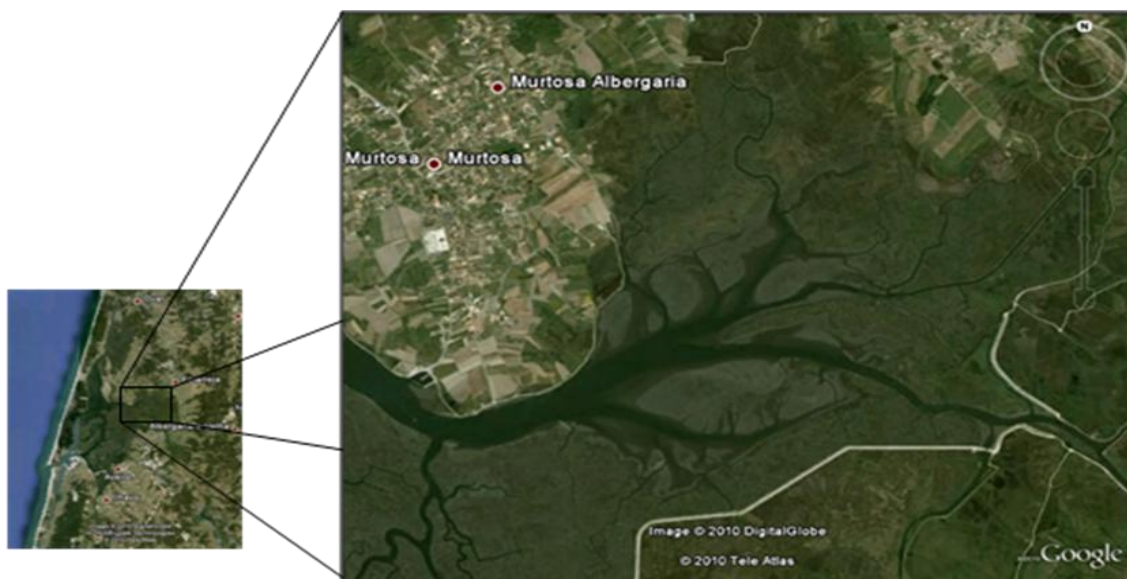


Figura II.1: Fotografia de satélite do local de colheita, Largo do Laranjo, Ria de Aveiro, Portugal.

O estudo centrou-se num local de colheita, denominado por Largo do Laranjo. O Largo do Laranjo localiza-se na costa noroeste de Portugal, na Ria de Aveiro (Figura II.1).

A Ria de Aveiro é uma lagoa costeira localizada ao longo do Oceano Atlântico e da costa Ocidental portuguesa rodeada por diversos aglomerados populacionais e centros industriais. Esta Ria constitui uma zona húmida de elevada importância, sendo classificada

como ZPE “Ria de Aveiro” (Zona de Protecção Especial, Decreto-Lei n.º 384-B/99 de 23 de Setembro), biótopo CORINE “Ria de Aveiro” (n.º C12100019) e IBA.

1.2 Procedimento de colheita

Foram efectuadas duas colheitas, uma a 18 e outra a 25 de Janeiro de 2010. Foram seleccionados espécimes aparentemente saudáveis, sem marcas exteriores de doença. Desta forma pretendeu-se evitar um possível isolamento de organismos endofíticos patogénicos (Bacon, 2002).

1.3 Tratamento das amostras

Após a colheita as plantas foram imediatamente tratadas ou mantidas a 4°C por um período inferior a 24 horas até serem tratadas.

1.3.1 Esterilização da superfície e preparação das amostras

1.3.1.1 Pré lavagem

As plantas colhidas foram lavadas em água corrente, no laboratório. A pré-lavagem das amostras é um passo importante, pois permite a eliminação de parte da microflora superficial, bem como a remoção de resíduos aí localizados. Este procedimento permite um aumento da eficácia dos passos subsequentes.

1.3.1.2 Esterilização

Após a pré-lavagem, foram seleccionadas separadamente 5g de caules, folhas e frutos e 2g de raízes dos espécimes colhidos, de forma a obter-se uma amostra significativa.

Na câmara de fluxo laminar procedeu-se à esterilização das amostras, segundo o protocolo abaixo descrito.

1. Colocação da amostra num tubo estéril;

- Realização da esterilização de acordo com a respectiva sequência, com agitação constante:

Raízes

- 10 min PBS;
- 1 min Etanol 96%;
- 30 min Hipoclorito de sódio a 5%;
- 1 min Etanol 96%;
- 3x3 min Água Estéril

Parte aérea

- 10 min PBS;
- 1 min Etanol 96%;
- 10 min Hipoclorito de sódio a 5%;
- 1 min Etanol 96%;
- 3x3 min Água Estéril

1.3.2 Sementeira

Para realização da sementeira procedeu-se como descrito abaixo. Todas as sementeiras foram efectuadas em triplicado.

- Maceração em almofariz com adição de 10ml de PBS;
- Preparação de quatro tubos: **1**-Extrato; **2**-diluição 10^{-1} ; **3**-diluição 10^{-2} ; e **4**-3^a lavagem em água estéril;
- Inoculação de aliquotas de 0,1mL dos tubos 2 e 3 em TSA;
- Inoculação de aliquota de 0,1mL do tubo 4 em TSA (controlo de assepsia).
- Incubação a 28°C durante 72h.

2. Meios de cultura

2.1. Meio de cultura

O meio de cultura foi preparado segundo as indicações do fabricante, sendo a sua composição apresentada para volumes de 1 litro. Após a preparação o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

TSA (“Trypticase Soy Agar” – Merk)

Peptona de caseína	17,0g
Pectona de soja	3,0g
D (+) Glicose	2,5g

Cloreto de sódio	5,0g	
Potássio di-hidrogenofosfato	2,5g	
Agar-agar	15g	(pH 7,3 ± 0,2 a 25 ⁰ C)

2.2. Meios para detecção de actividades enzimáticas extracelulares

As actividades enzimáticas extracelulares foram testadas com recurso a diferentes meios que permitem evidenciar a existência de: actividade amilolítica, actividade proteolítica, actividade lipolítica, actividade de celulase, actividade de xilanase e actividade pectinolítica. Os meios utilizados têm como meio base o TSB, ao qual se adicionaram substratos adequados para a detecção das diferentes actividades e agar-agar. Seguidamente são apresentadas as composições dos meios utilizados para volumes de 1 litro.

Agar de amido

TSB	30,0g
Agar-agar	15,0g
Amido	2,0g

Meio de Skim Milk

TSB	30,0g
Agar-agar	15,0g
Skim milk	10,0g

(Nota: A solução de skim milk deve ser esterilizada separadamente e adicionada ao restante meio antes da utilização)

Meio de lipases

TSB	30,0g
Agar-agar	15,0g
Tween 20	1%

(Nota: O Tween 20 deve ser esterilizado separadamente e adicionado ao meio restante na proporção de 1mL por cada 100 mL de meio)

Meio de celulose

TSB	30,0g
Agar-agar	15,0g
Carboximetilcelulose	5g

Meio de xilano

TSB	30,0g
Agar-agar	15,0g
Xilano	5g

Meio de pectina

TSB	30,0g
Agar-agar	15,0g
Pectina	5g (pH 7,0)

3. Conservação dos microrganismos

As culturas foram inoculadas em placas de TSA e incubadas a 28°C, durante 48 horas. A partir de colônias isoladas, procedeu-se à amplificação das culturas em meio líquido (TSB). A conservação foi feita no mesmo meio, com a adição de glicerol na proporção de 20%, e à temperatura de -80°C.

4. Reagentes**4.1. Composição de soluções de uso geral****PBS**

140 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4)
1,5 mM KH₂PO₄

TE

10 mM Tris-HCl
1mM EDTA (pH 8,0)

TAE 1x

40mM Tris base
40mM Acetato
2mM EDTA (pH 8,0)

CIA

Clorofórmio e álcool isoamílico, 24:1

4.2. Enzimas para extracção de ácidos nucleicos

Para extracção de ácidos nucleicos foi utilizada Lisozima (Boehring Mannheim) preparada por solubilização de preparado comercial em 1 mL de água estéril a uma concentração final de 50 mg/mL.

5. Marcadores de peso molecular para DNA

Como marcadores de peso molecular foram utilizados o marcador Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas), ready-to-use e o marcador Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

6. Extracção de DNA das bactérias isoladas

O DNA total das bactérias previamente isoladas foi preparado a partir de culturas frescas, segundo o método abaixo descrito. A partir deste método foi obtido DNA total destinado à posterior utilização em reacções de PCR.

Extracção de DNA Total Bacteriano (adaptado de Alves et al, 2003)

1. Com um palito estéril ou uma ansa seleccionar uma colónia isolada da placa de agar.
2. Ressuspender em 1mL de meio de cultura líquido (em eppendorf de 2mL).
3. Incubar overnight, à temperatura adequada, com agitação (100 rpm).
4. Retirar 500µL de cultura para um novo eppendorf e sedimentar as células, centrifugando 5 min a 13.000 rpm.
5. Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 50 µL de tampão TE.
6. Adicionar 5 µL de solução de lisozima e incubar 1 h, a 37°C.
7. Adicionar 50 µL de solução de lise (KIT Fermentas #K0512) e incubar 10 min, a 65°C.
8. Adicionar 100 µL de clorofórmio e misturar por inversão (3 a 5 vezes).
9. Centrifugar 5 min a 13.000 rpm.
10. Transferir a fase superior aquosa para um novo eppendorf.
11. Adicionar 100 µL de isopropanol e misturar.
12. Centrifugar 10 min a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante.
13. Lavar o pellet com 100 µL de etanol a 70%. Bater lateralmente para soltar o pellet.
14. Centrifugar 10 min a 13.000 rpm, descartar o sobrenadante e secar o pellet.
15. Ressuspender o pellet em 50 µL tampão TE.

7. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

Nas reacções de PCR efectuadas foram utilizados reagentes (tampões e MgCl₂ de marca Promega e dNTP's fornecidos por Fermentas) e enzima (GoTaq DNA Polimerase, comercializada pela Promega). As reacções foram efectuadas num termociclador MyCycler Personal Thermal Cycler (comercializado por Bio-Rad).

Neste procedimento foram utilizados os primers ERIC1R e ERIC2 (Anexo 1).

ERIC-PCR

1. Preparar a seguinte reacção de amplificação:

Reacção (25 µL)	Volume	Concentração final
H ₂ O	variável	-----
DMSO	1,25 µL	5%
MgCl ₂	3 µL	3mM
Buffer	5 µL	1x
dNTP	1,5 µL	180µM
Primer F	1 µL	1 µM
Primer R	1 µL	1 µM
<i>Taq</i> 19olymerase	0,1 µL	0,5U
DNA template	0,5 µL	50-100ng

2. Proceder à amplificação por PCR, de acordo com o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial de 3 min. A 95°C, seguida de 35 ciclos (desnaturação a 94°C, 1 min; “annealling” a 52°C, 1 min; extensão a 65°C, 8 min) e uma extensão final de 16 min, a 65°C. No final, manter os tubos a 15°C.

3. Observar uma alíquota de cada reacção de PCR num gel de agarose a 1,5% em TAE 1x.

8. Electroforese de DNA

8.1 Electroforese em gel de agarose convencional

Foram preparados géis de agarose (SeaKem ®LE Agarose) a diferentes concentrações (0,8% a 1,5%) consoante o tamanho dos fragmentos a visualizar, decorrendo as electroforeses a 80V em TAE 1x. As amostras foram carregadas no gel após adição de 1/6 do volume de tampão de carga. O tampão de carga utilizado é comercializado por Fermentas e segundo as indicações do fabricante é composto por:

10 mM Tris-HCl (pH 7.6),
0.03% azul bromofenol,
0.03% xileno cianol FF,
60% glicerol,
60 mM EDTA

8.2. Visualização do DNA

Após a electroforese os géis foram corados numa solução de brometo de etídio (EtBr) a 5µg/ml, em tampão de electroforese. Quando necessário lavaram-se os géis em água destilada para eliminar o excesso de EtBr. Após a coloração os géis foram visualizados com recurso ao “Molecular Imager ® Gel Doc TM XR+ with Image Lab TM Software”, um equipamento comercializado por Bio-Rad.

9. Amplificação da região 16S

Nas reacções de PCR efectuadas foram utilizados reagentes (tampões e MgCl₂ de marca Promega e dNTP's fornecidos por Fermentas) e enzima (*GoTaq* DNA Polimerase, comercializada pela Promega). Tal como descrito anteriormente, as reacções foram efectuadas com recurso a um termociclador MyCycler Personal Thermal Cycler (comercializado por Bio-Rad).

Neste procedimento foram utilizados os primers 27F e 1492R.

16S rDNA-PCR

1. Preparar a seguinte reacção de amplificação:

Reacção (25 µL)	Volume	Concentração final
H ₂ O	variável	-----
DMSO	1,25µL	5%
MgCl ₂	3 µL	3mM
Buffer	5 µL	2x
dNTP	0,5 µL	40µM
Primer F	1,0 µL	0,4µM
Primer R	1,0 µL	0,4µM
<i>Taq</i> 20olymerase	0,1 µL	0,5U
DNA template	1 µL	50-100ng

2. Proceder à amplificação por PCR, de acordo com o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial de 3 min. A 94⁰C, seguida de 30 ciclos (desnaturação a 94⁰C, 30 seg.; “annealling” a 52⁰C, 30seg.; extensão a 72⁰C, 1:30 min.) e uma extensão final de 10 min, a 72⁰C. No final, manter os tubos a 15⁰C.

3. Observar uma alíquota de cada reacção de PCR num gel de agarose a 1% em TAE 1x.

10. Purificação dos Produtos de Amplificação

Os produtos resultantes da amplificação por PCR do gene rDNA 16S foram purificados com recurso ao kit “JETQUICK PCR Purification Spin Kit”, comercializado por Genomed, segundo o protocolo descrito em seguida.

Purificação de produtos de PCR

1. Preparação da amostra:

Adicionar 400µL de solução H1 a 100µL de produto de PCR

2. Carregamento da coluna:

Colocar uma coluna JetQuick spin num tubo de 2ml

Carregar a mistura obtida no passo “1” na coluna.

Centrifugar a velocidade superior a 12.000rpm durante 1min.

Descartar o líquido

3. Lavagem da coluna

Inserir novamente a coluna num tubo e adicionar 500µL da solução H2 reconstituída.

Centrifugar a velocidade superior a 12.000rpm durante um minuto.

Descartar o líquido e colocar a coluna novamente no tubo.

Centrifugar à velocidade máxima durante 1min.

4. Eluição do DNA

Colocar a coluna em tubos novos de 1,5ml e adicionar 50µL de água estéril (aquecida previamente a 65°C) directamente no centro da matriz de sílica da coluna JetQuick spin.

Centrifugar a velocidade superior a 12.000rpm durante 2min.

As soluções referidas como H1 e H 2 são parte integrante do kit e segundo o fornecedor são constituídas por:

Solução H1

Contem cloridrato de guanidina, isopropanol

Solução H2

Deve ser reconstituída previamente, por adição de etanol absoluto

Contém etanol, NaCl, EDTA e Tris/HCl

11. Determinação da sequência nucleotídica

A determinação da sequência nucleotídica dos produtos de amplificação do gene rDNA 16S foi realizada na firma GATC (Alemanha). Os resultados da sequenciação foram visualizados e editados com recurso ao programa FinchTV (Geospiza). A identificação dos isolados foi efectuada por comparação com as sequências do 16S em bases de dados através do servidor ExTaxon 2.1 acessível on-line em <http://www.eztaxon.org/> (Chun et al, 2007).

12. Caracterização fisiológica

A detecção de actividades enzimáticas extracelulares foi realizada após crescimento em placa das estirpes em meio sólido, contendo substrato adequado a cada uma das actividades enzimáticas. Os ensaios realizados permitiram avaliar as actividades enzimáticas pela produção de halos transparentes, ou produção de cor no meio de cultura. Todos os ensaios foram precedidos de diluição da cultura em 500µL de NaCl a 0,9%.

12.1 Actividade amilolítica

A detecção da produção de amilase, por ensaio em placa de Petri, foi realizada segundo o seguinte procedimento:

Detecção de actividade Amilolítica

-
1. Inocular uma placa de Petri contendo Agar de Amido, com 1µL da cultura da estirpe a testar.
 2. Incubar a 28°C durante 48h.
 3. Revelar a hidrólise do amido, inundando a placa com soluto de Lugol. O meio adquire uma coloração azulada após reacção com o soluto de Lugol nas zonas em que não ocorreu hidrólise e apresenta-se acastanhado a claro nas zonas hidrolizadas.
-

12.2 Actividade proteolítica

A detecção da produção de protease, por ensaio em placa de Petri, foi realizada segundo o seguinte procedimento:

Detecção de actividade Proteolítica

1. Inocular uma placa de Petri contendo Meio de Skim Milk, com 1 μ L da cultura da estirpe a testar.
 2. Incubar a 28°C durante 48h.
 3. A produção de proteases é revelada pela formação de um halo transparente em volta da colónia.
-

12.3 Actividade lipolítica

A detecção da produção de lipases, por ensaio em placa de Petri, foi realizada segundo o seguinte procedimento:

Detecção de actividade Lipolítica

1. Inocular uma placa de Petri contendo Meio de lipases, com 1 μ L da cultura da estirpe a testar.
 2. Incubar a 28°C durante 48h.
 3. A produção de enzimas lipolíticas é revelada pela presença de um precipitado, devido à formação de cristais a partir do sal de cálcio de ácido láurico libertado pela enzima.
-

12.4 Actividade de celulase

A detecção da produção de celulase, por ensaio em placa de Petri, foi realizada segundo o seguinte procedimento:

Detecção de actividade Celulolítica

1. Inocular uma placa de Petri contendo Meio de Celulose, com 1 μ L da cultura da estirpe a testar.
 2. Incubar a 28°C durante 48h.
 3. Para revelar as zonas de hidrólise, corar durante 15min com uma solução de Vermelho do Congo 1mg/mL. De seguida descorar com NaCl 1M.
-

12.5 Actividade de xilanase

A detecção da produção de xilanases, por ensaio em placa de Petri, foi realizada segundo o seguinte procedimento:

Detecção de actividade Xilanolítica

1. Inocular uma placa de Petri contendo Meio de Xilano, com 1 μ L da cultura da estirpe a testar.
 2. Incubar a 28°C durante 48h.
 3. Para revelar as zonas de hidrólise, corar durante 15min com uma solução de Vermelho do Congo 1mg/ml. De seguida descorar com NaCl 1M.
-

12.6 Actividade pectinolítica

A detecção da produção de pectinases, por ensaio em placa de Petri, foi realizada segundo o seguinte procedimento:

Detecção de actividade Pectinolítica

1. Inocular uma placa de Petri contendo Meio de Pectina, com 1 μ L da cultura da estirpe a testar.
 2. Incubar a 28°C durante 48h.
 3. Revelar a hidrólise de pectina, inundando a placa com uma solução de CTAB a 1%. Este reagente precipita a pectina intacta, revelando zonas de hidrólise transparentes, em volta da cultura.
-

13. Análise Computacional

Os perfis de bandas foram analisados com recurso ao software GelCompar II (Applied Maths). Utilizando o marcador de peso molecular e ambas as extremidades do gel os géis foram normalizados. A opção “rolling disk” foi utilizada para subtração do “background”. As bandas de DNA foram detectadas pelo software cuidadosamente verificadas por inspeção visual de modo a corrigir possíveis detecções insatisfatórias. Os níveis de similaridade dos perfis foram calculados usando o coeficiente de Pearson gerando uma matriz de similaridade. A partir desta matriz foi gerado um dendrograma pelo método UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages).

As sequências de 16S rDNA foram alinhadas com recurso ao programa ClustalX 2 (Larkin et al, 2007), sendo seleccionadas além das estirpes obtidas, sequências das estirpes depositadas na base de dados do GeneBank. A partir deste alinhamento duplo das sequências de 16S rDNA foi construída uma árvore filogenética pelo método “neighbour-joining”, utilizando uma medida de correcção de distâncias Kimura-2-parameter.

3. Resultados e Discussão

1. Teor de bactérias endofíticas cultiváveis

A enumeração de bactérias cultiváveis foi realizada para as duas colheitas efectuadas, tendo-se obtidos os valores totais médios para cada uma das secções da planta consideradas (Tabela III.1). Tendo em consideração as quantidades de tecido utilizado (ver material e métodos) foi calculado o teor de bactérias por grama de tecido (Tabela III.2). Para este cálculo foram consideradas as diluições cujos valores se encontravam dentro dos limites considerados aceitáveis para contagem em placa, entre 30 e 300 colónias (Wistreich, 1997). Para a parte aérea considerou-se como válida a diluição 10^{-1} enquanto para a raiz se seleccionou como válida a diluição 10^{-2} .

Tabela III.1: Valores médios de contagens totais de bactérias endofíticas de *H. portulacoides* (calculados com base nos resultados das contagens em placa de três replicas para cada diluição), expressos em Unidades Formadoras de Colónias (UFC).

	Diluições			
	10^{-1}		10^{-2}	
	\bar{x}	Sx	\bar{x}	Sx
RZ	596	28,99	94,3	6,55
PA	97	58,18	15,5	9,98

Tabela III.2: Quantificação de teor de bactérias endofíticas de *H. portulacoides* por grama de tecido. Os resultados estão expressos em UFC/g.

	Diluições	
	10^{-1}	10^{-2}
RZ	-----	$4,72 \times 10^5$
PA	$1,94 \times 10^4$	-----

Comparando estatisticamente os resultados obtidos para as duas porções da planta, podemos concluir que os valores são estatisticamente diferentes ($p=0,002$), o que nos leva a concluir que de facto, na porção radicular existe um maior teor de bactérias endofíticas que na porção aérea.

Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores. Rosenblueth e Romero (2006) referem que foram encontradas bactérias endofíticas em diversos tecidos, como caules e sementes. Contudo, na maioria das plantas estudadas, nos tecidos das raízes encontram-se valores mais elevados de endofíticos comparativamente aos tecidos das partes aéreas. Esta constatação dever-se-á, possivelmente, a uma maior proximidade ao solo, bastante rico em microrganismos. A colonização das plantas ocorre através de pequenas fracturas criadas pelo desenvolvimento de raízes laterais ou na zona de alongamento e diferenciação da raiz (Rosenblueth e Romero, 2006). De facto, o solo parece ser uma importante e moderadora fonte de endófitos bacterianos (Surette et al., 2003). Algumas bactérias da rizosfera conseguem colonizar os tecidos internos da raiz e caules, demonstrando que esta poderá ser uma fonte de bactérias endofíticas.

A dispersão de endófitos inicialmente colonizadores da raiz para as partes aéreas das plantas pode ocorrer através da transpiração do caule (Compant et al., 2005), contudo, a filosfera desempenha também um importante papel como fonte de endófitos (Hallmann et al., 1997). Aberturas naturais, podem servir como porta de entrada para endófitos, é o caso dos estomas e hidatódios (Azevedo, 1998).

Os endófitos não parecem colonizar células vegetais vivas, sendo os vasos xilémicos e o espaço intercelular as localizações mais comumente descritas para endófitos bacterianos (Rosenblueth e Romero, 2006).

2. Caracterização fisiológica

Após a contagem, cada uma das réplicas e diluições foram analisadas tendo-se seleccionado duas colónias de cada tipo para posterior análise. A selecção das colónias teve como critérios características morfológicas, como a cor, tamanho e forma da colónia, procurando-se obter uma amostra que espelhasse a diversidade existente nos extratos. Assim, foram seleccionados 132 isolados no cômputo geral. Destes, 90 são representativos da raiz e 42 representam a parte aérea. Após a selecção os isolados foram repicados para placas de TSA e riscados por exaustão, de forma a garantir o seu isolamento, tendo sido posteriormente caracterizados.

A caracterização fisiológica dos isolados foi realizada tal como descrito na secção 2 do presente trabalho. Foram realizados diversos testes com o intuito de avaliar a produção de enzimas extracelulares por parte dos isolados.

Os resultados dos testes realizados foram expressos sob a forma de positivo (+) e negativo (-), tal como indicado na tabela abaixo (Tabela III.3).

Tabela III.3: Enzimas extracelulares produzidas em cultura pelos isolados.

Cód. isolado	Protease	Lipase	Celulase	Pectinase	Amilase	Xilanase
RZ108	-	-	-	+	-	+
RZ77	-	-	-	+	+	+
RZ80	-	-	-	+	+	+
RZ117	-	-	-	+	+	+
PA37	-	-	+	+	-	+
RZ112	-	-	+	+	-	+
PA5	-	-	+	+	+	+
PA7	-	-	+	+	+	+
PA8	-	-	+	+	+	+
PA15	-	-	+	+	+	+
PA16	-	-	+	+	+	+
PA17	-	-	+	+	+	+
PA22	-	-	+	+	+	+
PA24	-	-	+	+	+	+
PA29	-	-	+	+	+	+
PA32	-	-	+	+	+	+
PA35	-	-	+	+	+	+
PA36	-	-	+	+	+	+
PA97	-	-	+	+	+	+
PA99	-	-	+	+	+	+
PA102	-	-	+	+	+	+
PA103	-	-	+	+	+	+

Cód. aislado	Protease	Lipase	Celulase	Pectinase	Amilase	Xilanas
PA105	-	-	+	+	+	+
PA107	-	-	+	+	+	+
PA108	-	-	+	+	+	+
PA111	-	-	+	+	+	+
PA112	-	-	+	+	+	+
PA114	-	-	+	+	+	+
PA115	-	-	+	+	+	+
RZ3b	-	-	+	+	+	+
RZ12	-	-	+	+	+	+
RZ17	-	-	+	+	+	+
RZ24	-	-	+	+	+	+
RZ26	-	-	+	+	+	+
RZ27	-	-	+	+	+	+
RZ29	-	-	+	+	+	+
RZ31	-	-	+	+	+	+
RZ32	-	-	+	+	+	+
RZ35	-	-	+	+	+	+
RZ37	-	-	+	+	+	+
RZ39	-	-	+	+	+	+
RZ40	-	-	+	+	+	+
RZ41	-	-	+	+	+	+
RZ42	-	-	+	+	+	+
RZ45	-	-	+	+	+	+
RZ46	-	-	+	+	+	+
RZ47	-	-	+	+	+	+
RZ49	-	-	+	+	+	+
RZ50	-	-	+	+	+	+
RZ51a	-	-	+	+	+	+
RZ51b	-	-	+	+	+	+
RZ56	-	-	+	+	+	+
RZ57a	-	-	+	+	+	+
RZ57b	-	-	+	+	+	+
RZ63	-	-	+	+	+	+
RZ68	-	-	+	+	+	+
RZ75	-	-	+	+	+	+
RZ78	-	-	+	+	+	+
RZ82	-	-	+	+	+	+
RZ90	-	-	+	+	+	+
RZ93	-	-	+	+	+	+
RZ95	-	-	+	+	+	+
RZ102	-	-	+	+	+	+
RZ104	-	-	+	+	+	+
RZ111	-	-	+	+	+	+
RZ114	-	-	+	+	+	+
RZ115a	-	-	+	+	+	+
RZ115b	-	-	+	+	+	+
RZ115c	-	-	+	+	+	+
RZ118	-	-	+	+	+	+
PA3	-	+	+	+	+	+
PA4	-	+	+	+	+	+
PA6	-	+	+	+	+	+
PA9	-	+	+	+	+	+
PA12	-	+	+	+	+	+
PA20	-	+	+	+	+	+
PA21	-	+	+	+	+	+

Cód. aislado	Protease	Lipase	Celulase	Pectinase	Amilase	Xilanas
PA25	-	+	+	+	+	+
PA30	-	+	+	+	+	+
PA31	-	+	+	+	+	+
PA38	-	+	+	+	+	+
PA106	-	+	+	+	+	+
RZ4	-	+	+	+	+	+
RZ8	-	+	+	+	+	+
RZ9	-	+	+	+	+	+
RZ10	-	+	+	+	+	+
RZ15	-	+	+	+	+	+
RZ19	-	+	+	+	+	+
RZ23	-	+	+	+	+	+
RZ28	-	+	+	+	+	+
RZ30	-	+	+	+	+	+
RZ33	-	+	+	+	+	+
RZ34	-	+	+	+	+	+
RZ38	-	+	+	+	+	+
RZ72	-	+	+	+	+	+
RZ74	-	+	+	+	+	+
RZ1	+	-	+	+	+	+
RZ2	+	-	+	+	+	+
RZ7	+	-	+	+	+	+
RZ16	+	-	+	+	+	+
RZ20	+	-	+	+	+	+
RZ36	+	-	+	+	+	+
RZ53	+	-	+	+	+	+
RZ60	+	-	+	+	+	+
RZ67	+	-	+	+	+	+
RZ70	+	-	+	+	+	+
RZ71a	+	-	+	+	+	+
RZ73	+	-	+	+	+	+
RZ81	+	-	+	+	+	+
RZ85	+	-	+	+	+	+
RZ94	+	-	+	+	+	+
RZ96	+	-	+	+	+	+
RZ105	+	-	+	+	+	+
RZ106	+	-	+	+	+	+
RZ109	+	-	+	+	+	+
RZ110	+	-	+	+	+	+
PA1	+	+	+	+	+	+
PA2	+	+	+	+	+	+
PA10	+	+	+	+	+	+
PA23	+	+	+	+	+	+
PA27	+	+	+	+	+	+
PA100	+	+	+	+	+	+
RZ3a	+	+	+	+	+	+
RZ14	+	+	+	+	+	+
RZ44a	+	+	+	+	+	+
RZ59	+	+	+	+	+	+
RZ66	+	+	+	+	+	+
RZ71b	+	+	+	+	+	+
RZ86	+	+	+	+	+	+
RZ91	+	+	+	+	+	+
RZ98	+	+	+	+	+	+

Todos os isolados testados apresentaram actividade de pectinase e de xilanase positiva. A maioria dos isolados apresenta resultados positivos relativamente às actividades celulolítica (Figura III.1) e amilolítica (Figura III.2), contrariamente ao que acontece em relação às actividades proteolítica (Figura III.3) e lipolítica (Figura III.4).



Figura III.1: Resultado dos testes de determinação de actividade celulolítica.



Figura III.2: Resultado dos testes de determinação de actividade amilolítica.

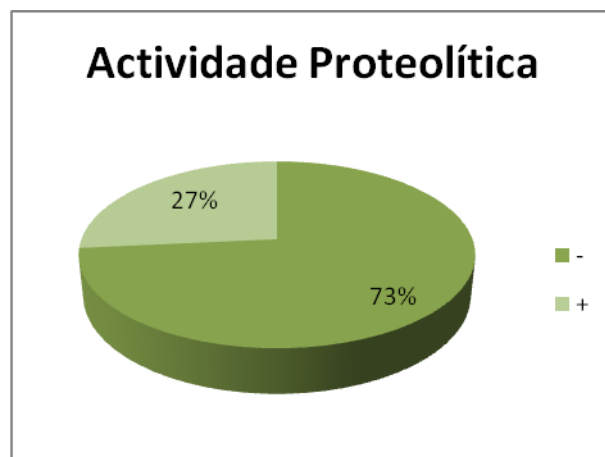


Figura III.3: Resultado dos testes de determinação de actividade proteolítica.



Figura III.4: Resultado dos testes de determinação de actividade lipolítica.

A produção de enzimas que verificámos através destes testes poderá ser de grande interesse. Estas enzimas poderão ter um papel fundamental na colonização da planta. Tal como proposto por Hallmann et al (1997) enzimas proteolíticas e celulolíticas produzidas por endófitos têm um papel activo no processo de infecção, enquanto a pectato liase está envolvida no processo de colonização (Kovtunovych et al, 1999).

A maioria dos isolados testados neste estudo apresentou actividade amilolítica positiva, demonstrando ser capaz de degradar amido solúvel. Os endófitos são os primeiros colonizadores dos tecidos mortos da planta, uma vez que já se encontram no seu interior quando a planta está ainda viva (Guo et al., 1998). O amido é geralmente armazenado na planta como fonte de alimento ao longo do seu ciclo de vida, sendo uma das fontes de

alimento mais facilmente digerida. Após a morte da planta, este amido ficará disponível e os endófitos poderão consumi-lo antes de outros colonizadores aparecerem (Choi et al., 2005).

Segundo alguns autores (Choi et al., 2005), endófitos que degradam xilano degradam também celulose. No presente estudo tal não se verificou, uma vez que 3% dos isolados demonstrou não degradar celulose. O xilano e a celulose são componentes da parede celular da planta, assim, a produção de enzimas que degradam estes compostos permitirá ao endófito a sua entrada na planta.

3. Diversidade filogenética

3.1 Estrutura geral da comunidade endofítica

Para determinar se as comunidades bacterianas endofíticas encontradas nas diferentes partes da planta consideradas eram realmente diferentes em termos de diversidade filogenética, 131 isolados foram caracterizados. Destes, 49 são provenientes da parte aérea e 89 da raiz. O DNA dos isolados seleccionados foi obtido pela metodologia já descrita. Após a extracção foi efectuada a tipagem dos isolados por ERIC-PCR.

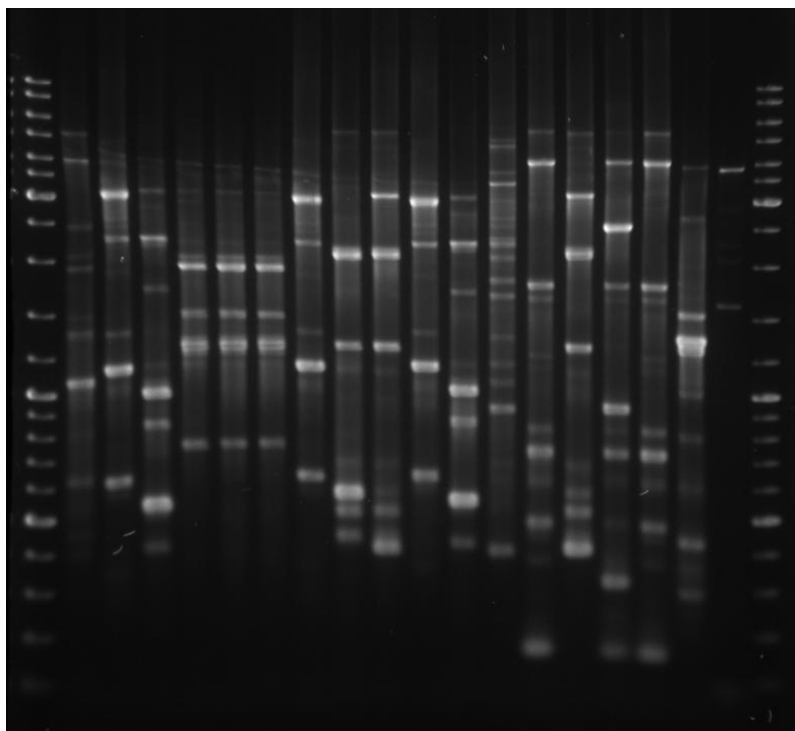


Figura III.5: Exemplos de padrões de fingerprinting obtidos por ERIC-PCR, realizado segundo o procedimento explanado na secção Materiais e Métodos.

Com recurso ao software de análise GelCompar II para Windows de Applied Maths os perfis de bandas foram analisados. Os níveis de similaridade dos perfis foram calculados usando o coeficiente de Pearson gerando uma matriz de similaridade. A partir desta matriz foi gerado um dendrograma (Figura III.6) pelo método UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages).

Uma primeira análise do dendrograma permite-nos verificar que de um modo geral não existe uma separação total entre os isolados da raiz e da parte aérea. Contudo, verifica-se que os isolados das diferentes partes alternam entre si, formando grupos de isolados de cada uma das partes.

Tendo com base uma similaridade de cerca de 60% foram identificados 55 clusters. O tamanho de cada um destes clusters é variável, sendo que alguns clusters compreendem cerca de doze isolados, enquanto outros apresentam dimensões reduzidas, sendo constituídos por apenas um isolado. Partindo do pressuposto que cada um destes clusters seria um aglomerado de isolados da mesma espécie, passou-se à identificação de isolados

representativos desses mesmos clusters. Foram seleccionados, sempre que possível, pelo menos dois representantes de cada cluster e procedeu-se à amplificação do gene que codifica para a subunidade 16S do RNA ribossomal. Os produtos de PCR obtidos foram sequenciados. As sequências de 16S rDNA obtidas foram alinhadas com recurso ao programa ClustalX 2 (Larkin et al, 2007), sendo seleccionadas além das estirpes obtidas, sequências das estirpes depositadas na base de dados do GeneBank.

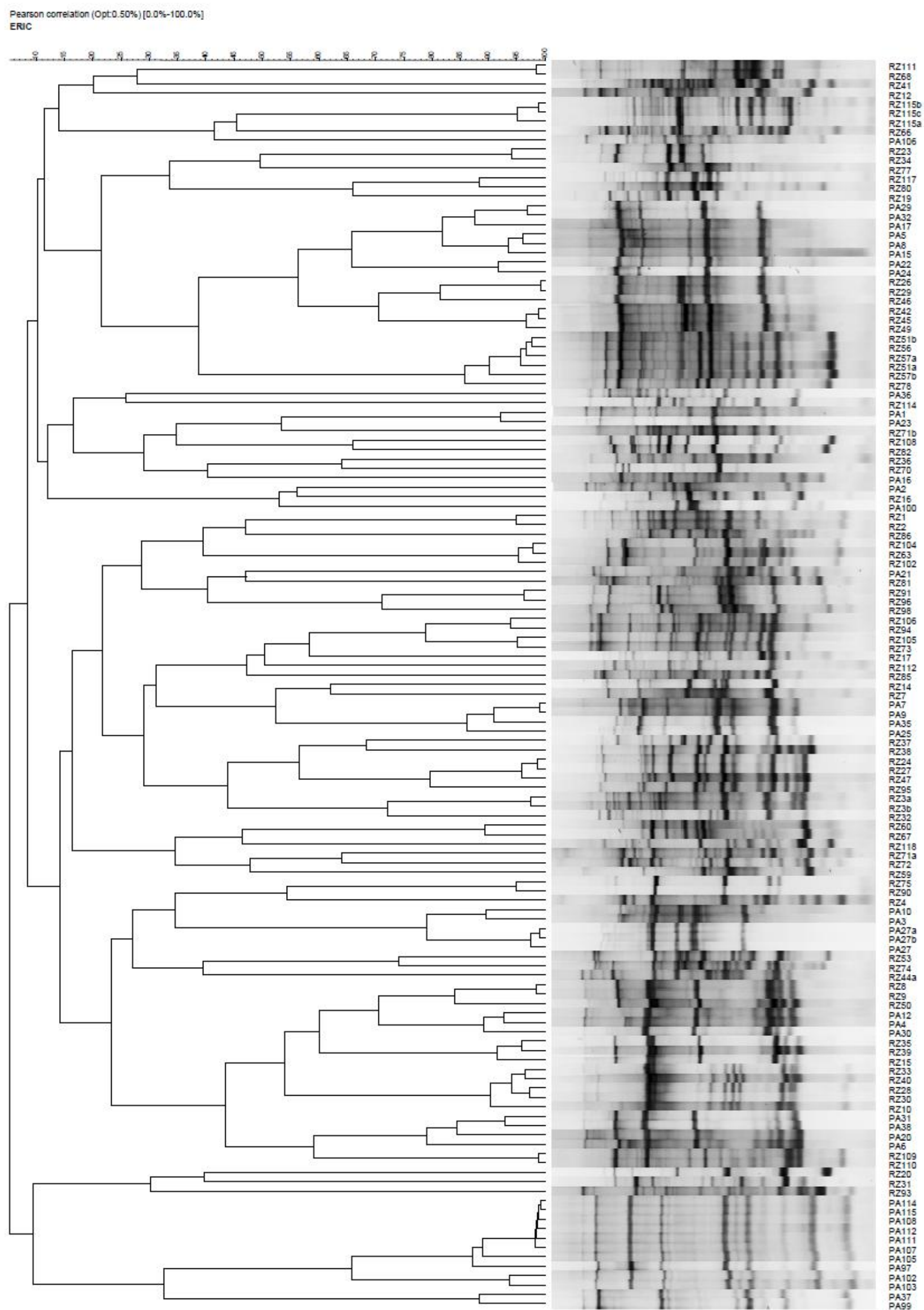


Figura III.6: Dendrograma representativo da similaridade genética dos isolados analisados.

3.2 Identificação dos isolados bacterianos

A afiliação filogenética das sequências nucleotídicas foi realizada inicialmente através dos programas BLAST (Altschul et al., 1997) e megaBLAST (Zang et al., 2000) por comparação com a base de dados de estirpes tipo com nomes procarióticos válidos publicados (Chun et al., 2007). As 50 sequências com pontuações mais elevadas foram seleccionadas para o calculo de similaridade da sequência utilizando um algoritmo de alinhamento global implementado através do servidor EzTaxon server (<http://www.eztaxon.org/>; Chung et al., 2007). Os resultados da sequenciação permitiram a classificação das bactérias identificadas em três Filos distintos.

Os valores de similaridade das sequências do gene 16S rRNA obtidas neste estudo comparativamente com as sequências da base de dados, bem como a identificação do parente mais próximo (closest relative) são apresentadas na tabela III.4. Isolados com valores de similaridade superiores a 99% são normalmente considerados como sendo representantes da mesma espécie e com valores compreendidos entre 97% e 99% são provavelmente representantes do mesmo género mas de espécies diferentes. Similaridades inferiores a 93% geralmente sugerem um novo género, situação que necessita de confirmação. Similaridades entre 93% e 97%, poderão ser representativas quer de um novo género quer de uma nova espécie (Janda e Abbott, 2007).

Os isolados em estudo apresentam valores de similaridade que variam entre 96,5% e 100%. Os isolados com similaridade inferior a 97%, RZ34 (similaridade de 96,8%) e RZ41 (similaridade de 96,5%), poderão, segundo a classificação atrás descrita, ser representativos quer de um novo género quer de uma nova espécie, situação que, tal como especificado anteriormente, deverá ser confirmada em estudos futuros.

Relativamente aos isolados que apresentaram valores de similaridade compreendidos entre 97% e 99%, podem ser classificados como pertencentes aos géneros indicados. Contudo, não é possível afirmar que, efectivamente, pertencem à espécie indicada.

Tabela III.4: Afiliação filogenética das sequências bacterianas do gene 16S rRNA obtidas da comunidade endofítica de *Halimione portulacoides*, Parte Aérea e Raiz

Isolado	Closest BLAST match (Accession no.)	Similaridade	Filo	Classe	Ordem	Familia
PA1	<i>Curtobacterium herbarum</i> AJ310413	99,9%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
PA2	<i>Curtobacterium herbarum</i> AJ310413	99,8%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
PA3	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> AJ312209	100%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
PA4	<i>Pseudomonas sabulinigri</i> EU143352	98,9%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
PA10	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> AJ312209	100%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
PA15	<i>Microbacterium flavum</i> AB286029	97,7%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
PA16	<i>Microbacterium flavum</i> AB286029	98,0%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
PA17	<i>Microbacterium flavum</i> AB286029	98,4%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
PA20	<i>Pseudomonas sabulinigri</i> EU143352	98,4%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
PA21	<i>Altererythrobacter indicus</i> DQ399262	99,1%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>

Isolado	Closest BLAST match (Accession no.)	Similaridade	Filo	Classe	Ordem	Familia
PA24	<i>Microbacterium flavum</i> AB286029	98,4%	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae
PA27	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> AJ312209	100%	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae
PA35	<i>Pseudomonas</i> <i>seleniipraecipitatus</i> FJ422810	99,2%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
PA36	<i>Microbacterium pumilum</i> AB234027	98,4%	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae
PA99	<i>Pantoea brenneri</i> EU216735	99,9%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
PA100	<i>Pseudomonas</i> <i>seleniipraecipitatus</i> FJ422810	99,1%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
PA103	<i>Pantoea brenneri</i> EU216735	99,7%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
PA106	<i>Raoutella terrigena</i> Y17658	98,8%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
PA112	<i>Pantoea brenneri</i> EU216735	99,7%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
RZ1	<i>Pseudomonas lurida</i> AJ581999	99,7%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
RZ3A	<i>Pseudomonas jessenii</i>	99,0%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae

Isolado	Closest BLAST match (Accession no.)	Similaridade	Filo	Classe	Ordem	Familia
	AF068259					
RZ4	<i>Pseudomonas jessenii</i> AF068259	99,1%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ7	<i>Pseudomonas guineae</i> AM491810	99,7%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ12	<i>Pantoea eucalypti</i> EF688009	99,9%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
RZ16	<i>Pseudomonas guineae</i> AM491810	99,6%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ17	<i>Pseudomonas migulae</i> AF074383	99,7%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ19	<i>Acinetobacter lwoffii</i> X81665	99,2%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>
RZ20	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> AJ512504	100%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>
RZ27	<i>Pseudomonas sabulinigri</i> EU143352	98,6%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ29	<i>Microbacterium flavum</i> AB286029	98,5%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
RZ31	<i>Pseudomonas koreensis</i> AF468452	100%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ32	<i>Pseudomonas jessenii</i> AF068259	99,3%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>

Isolado	Closest BLAST match (Accession no.)	Similaridade	Filo	Classe	Ordem	Familia
RZ33	<i>Pseudomonas sabulinigri</i> EU143352	99,0%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ34	<i>Salinicola salarius</i> AM229316	96,8%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Halomonadaceae</i>
RZ36	<i>Microbacterium testaceum</i> X77445	99,2%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
RZ37	<i>Pseudomonas sabulinigri</i> EU143352	98,3%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ38	<i>Pseudomonas sabulinigri</i> EU143352	98,9%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ39	<i>Pseudomonas sabulinigri</i> EU143352	98,9%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ41	<i>Paenibacillus borealis</i> AJ011322	96,5%	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Paenibacillaceae</i>
RZ44A	<i>Arthrobacter russicus</i> AB071950	99,8%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>
RZ49	<i>Microbacterium pumilum</i> AB234027	98,2%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
RZ50	<i>Pseudomonas sabulinigri</i> EU143352	98,9%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ56	<i>Pseudomonas fragi</i> AF094733	99,3%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ59	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	100%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>

Isolado	Closest BLAST match (Accession no.)	Similaridade	Filo	Classe	Ordem	Familia
	AJ312209					
RZ63	<i>Microbacterium schleiferi</i> AB004723	98,1%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
RZ66	<i>Pseudomonas jessenii</i> AF068259	99,0%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ67	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> AJ312209	100%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
RZ70	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i> AB105164	99,9%	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillales Familia XII. Incertae Sedis</i>
RZ72	<i>Pseudomonas jessenii</i> AF068259	98,9%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ77	<i>Arthrobacter niigatensis</i> AB248526	100%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>
RZ80	<i>Alcaligenes faecalis</i> AJ937889	99,0%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>
RZ81	<i>Pseudomonas reinekei</i> AM293565	99,5%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ85	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> AJ583501	99,9%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ86	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> EU103629	98,6%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
RZ90	<i>Staphylococcus equorum</i> AF527483	100%	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>

Isolado	Closest BLAST match (Accession no.)	Similaridade	Filo	Classe	Ordem	Familia
RZ93	<i>Erwinia rhapontici</i> U80206	99,3%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
RZ94	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> AJ936933	100%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
RZ95	<i>Pseudomonas sabulinigri</i> EU143352	99,1%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
RZ96	<i>Pseudomonas koreensis</i> AF468452	99,9%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
Rz98	<i>Pseudomonas koreensis</i> AF468452	99,9%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
RZ102	<i>Microbacterium sediminicola</i> AB286021	98,2%	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae
RZ105	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> AJ583501	100%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
RZ109	<i>Pseudomonas simiae</i> AJ936933	100%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
RZ110	<i>Pseudomonas trivialis</i> AJ492831	99,9%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
RZ111	<i>Enterobacter amnigenus</i> AB004749	99,5%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
RZ112	<i>Pseudomonas jessenii</i> AF068259	99,4%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
RZ114	<i>Janthinobacterium lividum</i>	99,9%	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae

Isolado	Closest BLAST match (Accession no.)	Similaridade	Filo	Classe	Ordem	Familia
	Y08846					
RZ115A	<i>Janthinobacterium lividum</i> Y08846	99,8%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>
RZ117	<i>Acinetobacter lwoffii</i> X81665	99,4%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>
RZ118	<i>Iodobacter fluviatilis</i> M22511	98,6%	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>

Tal como referido anteriormente os isolados identificados pertencem a três Filos: *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Firmicutes*. Na porção aérea da planta predominam isolados pertencentes ao Filo *Actinobacteria*, enquanto na raiz se verifica o predomínio do Filo *Proteobacteria*. No cômputo geral, observa-se a mesma tendência observada para as raízes, ocorrendo um predomínio de isolados pertencentes ao Filo *Proteobacteria*. De salientar ainda o facto do Filo *Firmicutes* estar apenas representado ao nível da raízes.

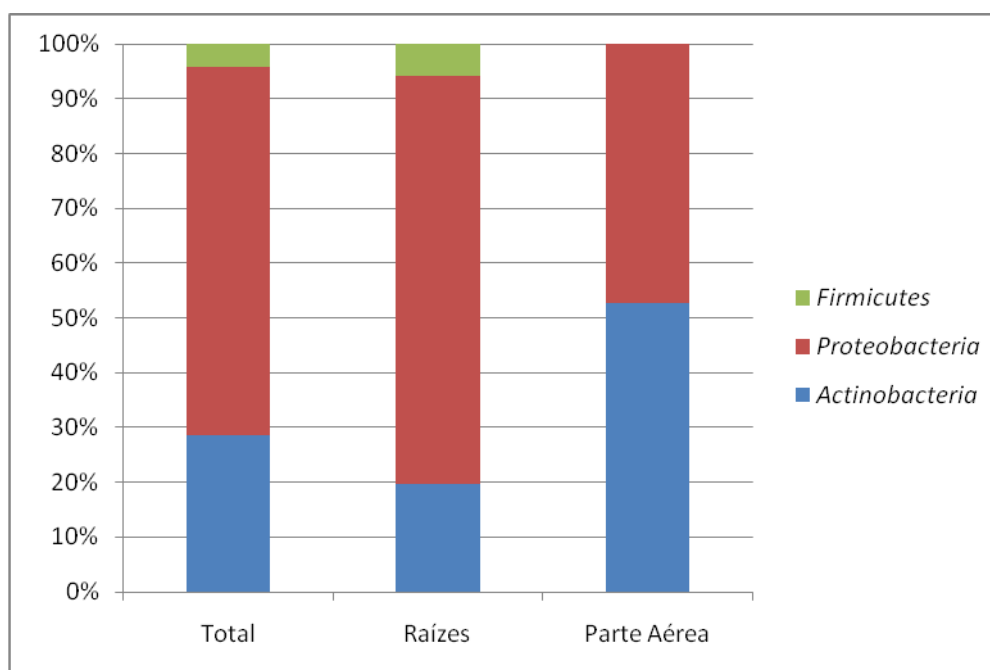


Figura III. 7: Proporção de grupos taxonómicos (Filos) representados pelos isolados endofíticos de *Halimione portulacoides* numa análise global (Total) e nas secções Raíz (RZ) e Parte Aérea (PA).

A maioria dos isolados pertence à Classe *Gammaproteobacteria*, contudo, quando analisados os resultados para cada uma das partes da planta, é possível concluir que esta predominância não se verifica. Ao nível da raiz há de facto um predomínio da Classe *Gammaproteobacteria*, sendo a Classe *Actinobacteria* a segunda classe mais representada. Nesta porção da planta foi ainda possível identificar isolados pertencentes às Classes *Bacilli* e *Betaproteobacteria*, exclusivas da raiz. Na parte aérea, a Classe mais frequente é *Actinobacteria*, seguida da Classe *Gammaproteobacteria*. Estando ainda presente nesta porção da planta a Classe *Alphaproteobacteria*, exclusiva da parte aérea da planta.

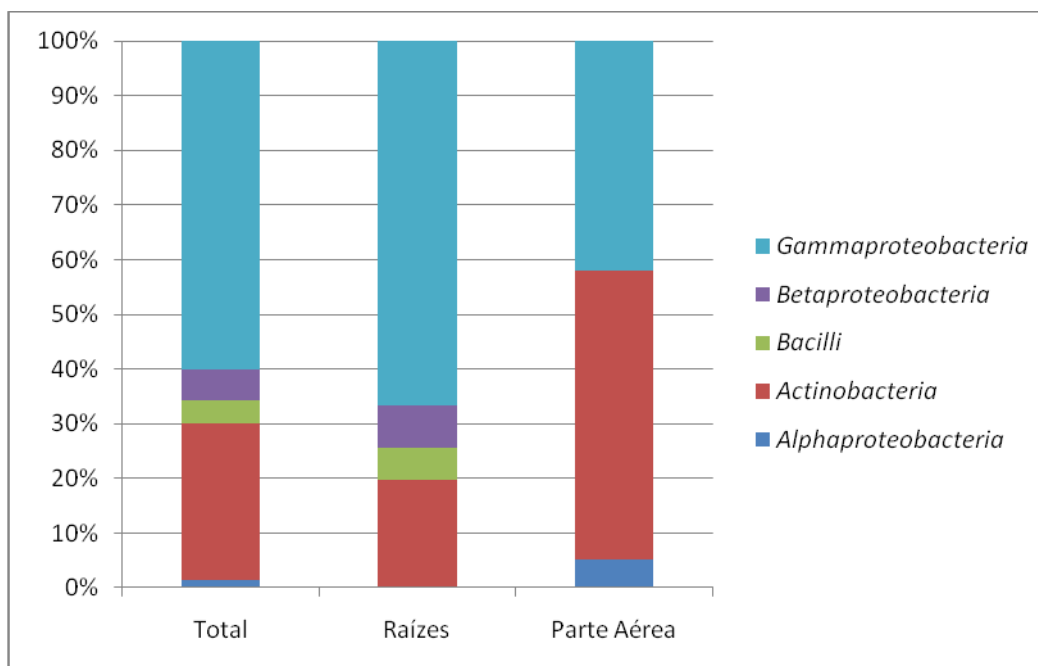


Figura III. 8: Proporção de grupos taxonômicos (Classes) representados pelos isolados endofíticos de *Halimione portulacoides* numa análise global (Total) e nas secções Raíz (RZ) e Parte Aérea (PA).

Quando classificados os isolados em termos de género é possível notar uma maior diversidade (Figura III.9). Esta diversidade é particularmente notada ao nível da raiz, estando representados quinze géneros distintos enquanto na parte aérea são identificados apenas seis géneros distintos.

Onze dos géneros identificados são aparentemente exclusivos da porção radicular, nomeadamente os géneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Exiguobacterium*, *Iodobacter*, *Janthinobacterium*, *Paenibacillus*, *Salinicola* e *Staphylococcus*.

À excepção dos Géneros *Althererythobacter* e *Raoultella* todos os géneros representados na parte aérea são também encontrados na raiz. Os géneros referidos como excepção, poderão ter origem distinta dos restantes isolados, sendo resultantes de colonização dos tecidos da parte aérea. Alguns autores referem que a entrada de organismos endofíticos na planta não ocorre apenas através da raiz, mas também de outros órgãos da planta, nomeadamente caule e folhas, através, por exemplo dos estomas (Baldotto et al., 2011).

Os Géneros *Pseudomonas* e *Microbacterium* são os mais comuns, representando cerca de 46% e 14% dos isolados identificados, respectivamente. O Género *Pseudomonas* é constituído por espécies bastante diversificadas, encontradas geralmente na microbiota do solo, em água e em plantas. As espécies pertencentes a este género são geralmente saprofitas ou patógenos oportunistas quer para o Homem quer para outros animais, com uma baixa propensão para se tornarem patogénios de plantas (Palleroni, 2010). Diversos estudos identificaram bactérias deste Género como endofíticas (Andreote et al., 2009; Assumpção et al., 2009; Zinniel et al., 2002).

O segundo Género mais comum, *Microbacterium*, está também bem distribuído em termos ecológicos, vivendo tipicamente na água. Este facto não contraria o presente estudo, uma vez que o habitat do sapal é precisamente inundado periodicamente, ficando assim as plantas em contacto com a água. A identificação de espécies pertencentes a este género como endofíticas foi já estabelecida por outros autores, como Zinniel et al. (2002). Este autor identifica pela primeira vez a espécie *Microbacterium testaceum*, também encontrada no presente estudo, como endofítica.

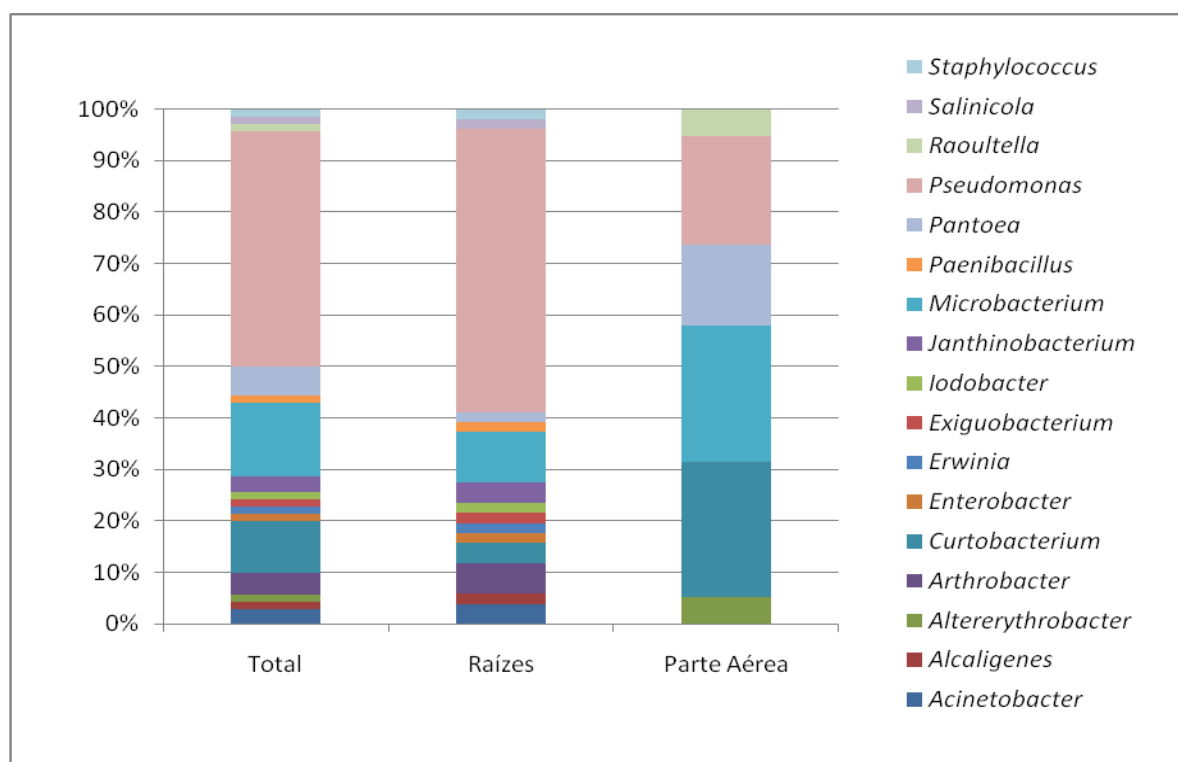


Figura III. 9: Proporção de grupos taxonómicos (Géneros) representados pelos isolados endofíticos de *Halimione portulacoides* numa análise global (Total) e nas secções Raiz (RZ) e Parte Aérea (PA).

O espectro de diferentes géneros foi superior na Classe Gammaproteobacteria (7 géneros). As classes Actinobacteria, Bacilli e Betaproteobacteria encontram-se igualmente representadas (3 géneros) enquanto apenas foi identificado um género pertencente à classe Alphaproteobacteria.

4. Árvores filogenéticas

A afiliação filogenética das sequências obtidas durante este estudo foi confirmada pela construção de árvores filogenéticas (Fig III.10, III.11 e III.12).

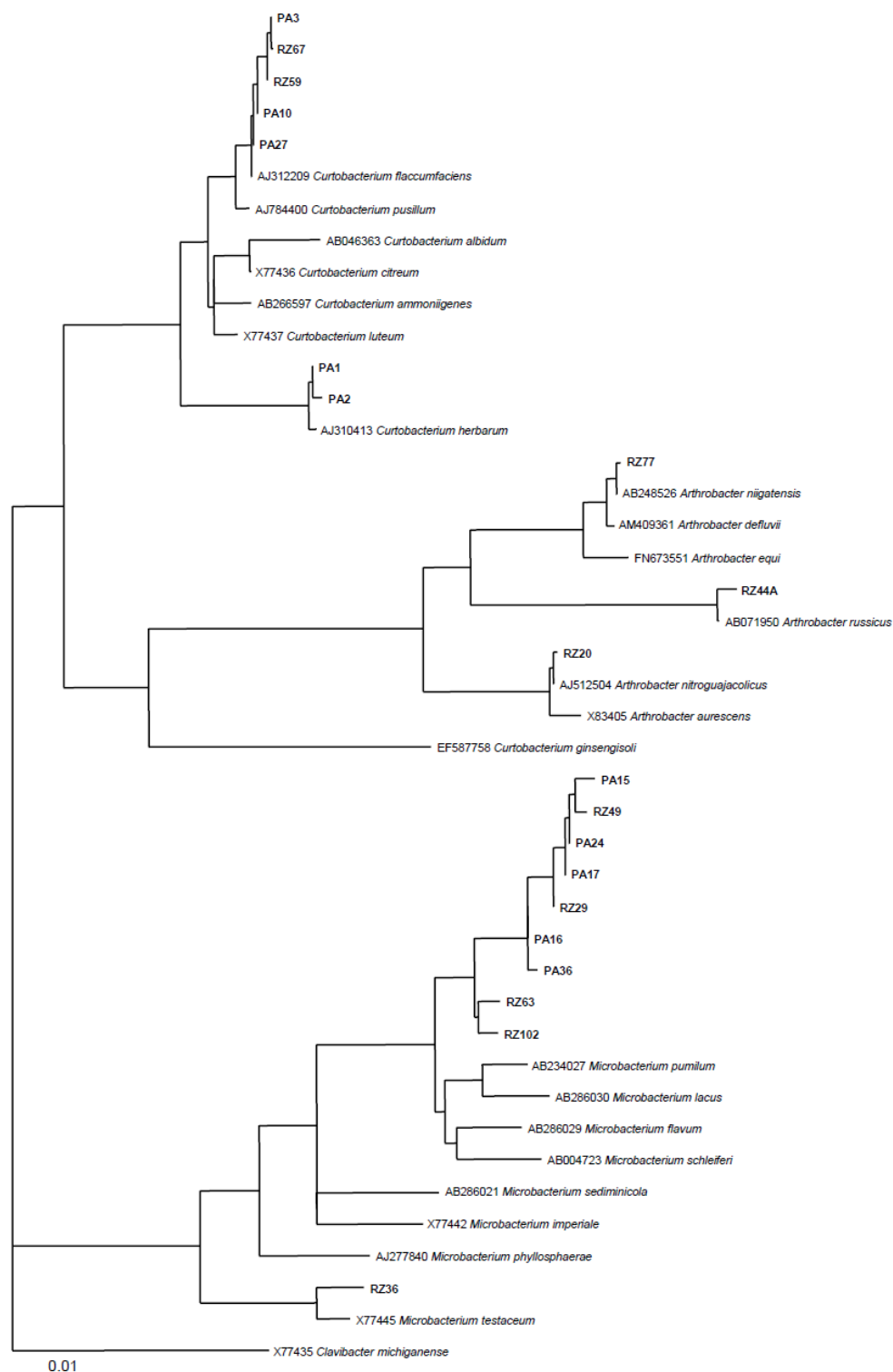


Figura III.10: Árvore filogenética baseada nas seqüências de rDNA 16S, mostrando as relações entre todos os isolados do Filo Actinobacteria analisados. Para a construção foi utilizado o método “neighbour-joining”, utilizando uma medida de correção de distâncias Kimura-2-parameter.

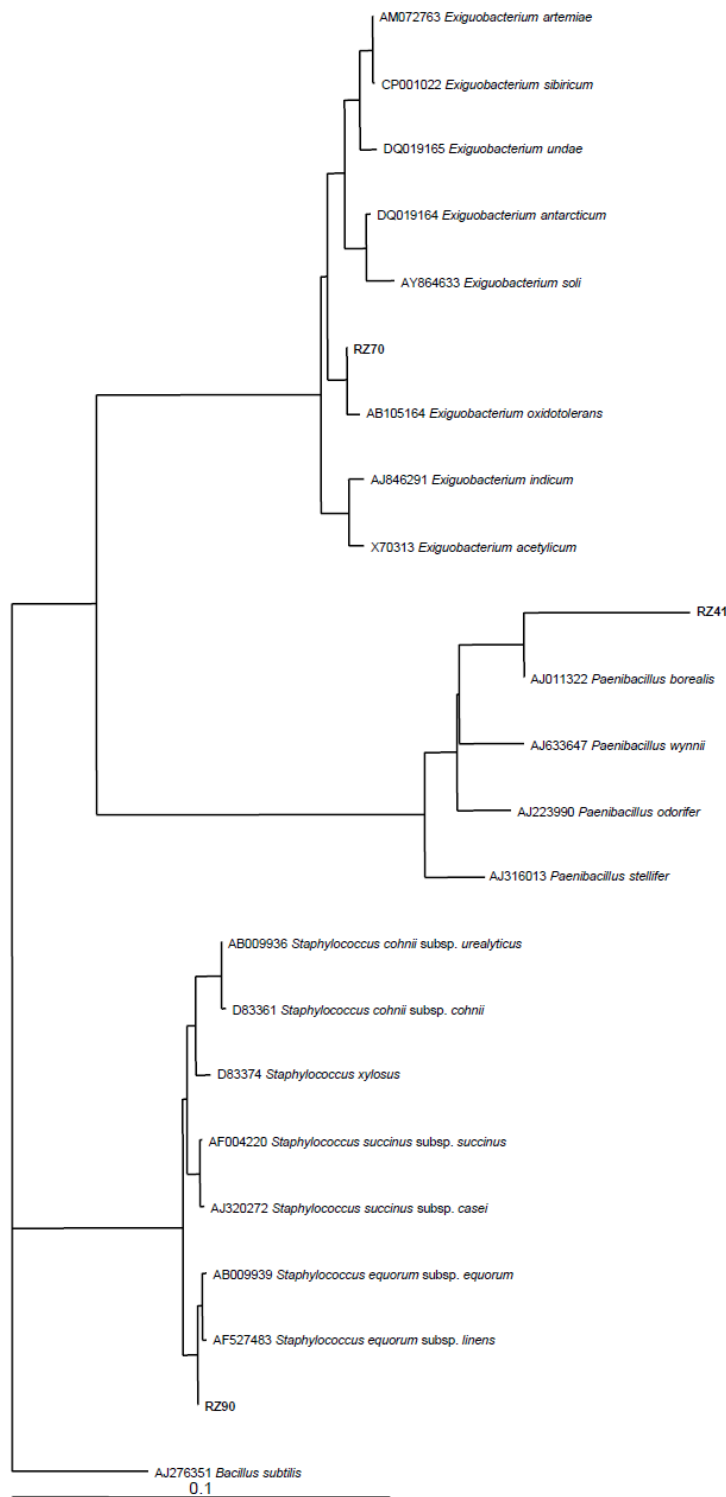


Figura III.11: Árvore filogenética baseada nas sequências de rDNA 16S, mostrando as relações entre todos os isolados do Filo Firmicutes analisados. Para a construção foi utilizado o método “neighbour-joining”, utilizando uma medida de correcção de distâncias Kimura-2-parameter.

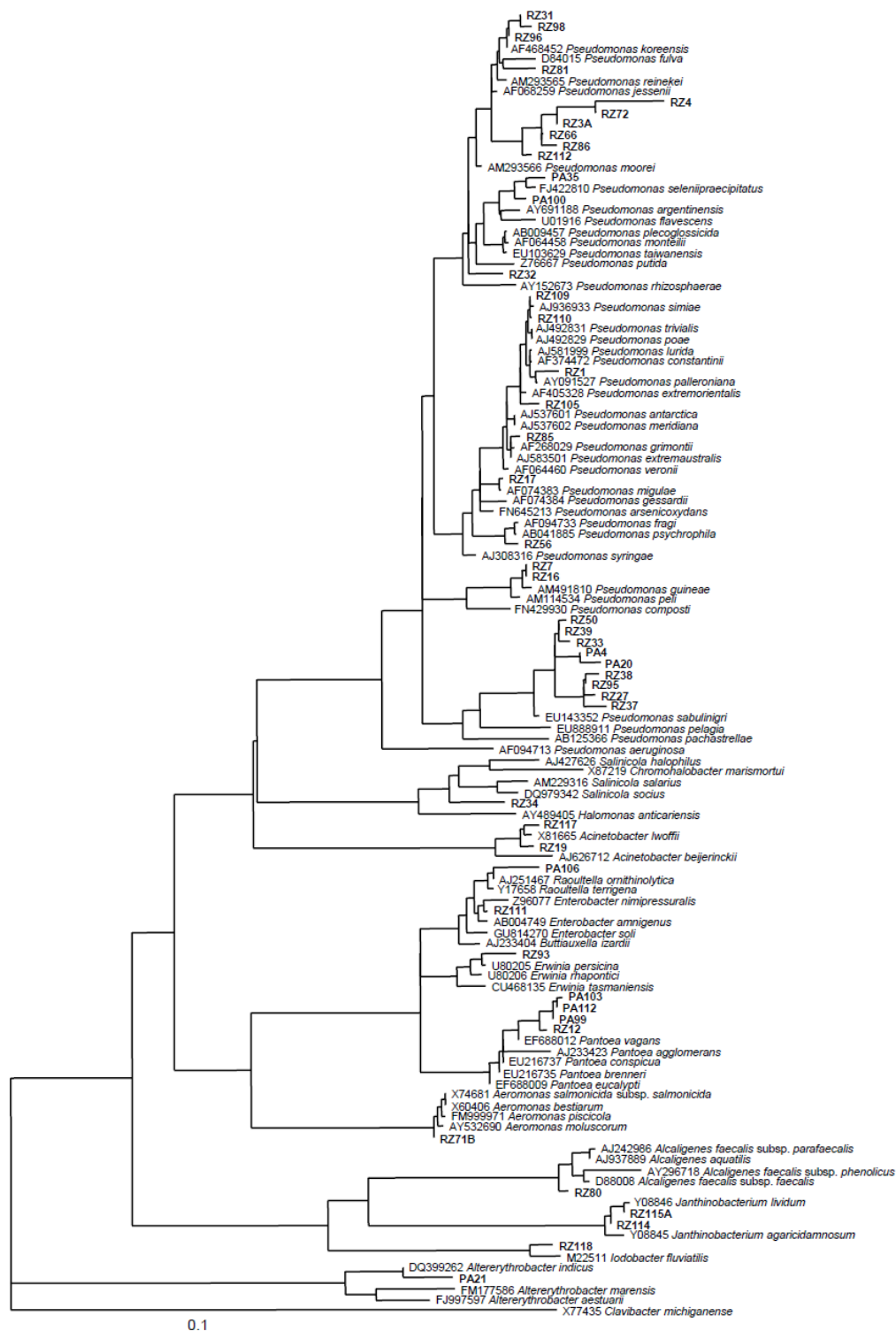


Figura III.11: Árvore filogenética baseada nas seqüências de rDNA 16S, mostrando as relações entre todos os isolados do Filo Proteobacteria analisados. Para a construção foi utilizado o método “neighbour-joining”, utilizando uma medida de correcção de distâncias Kimura-2-parameter.

A análise filogenética permitiu avaliar a relação filogenética dos isolados obtidos neste estudo em relação a espécies já descritas anteriormente. Esta análise filogenética sugere que alguns dos isolados podem representar espécies ainda não descritas. Contudo, para confirmar esta hipótese são necessários mais estudos, nomeadamente a obtenção da sequência completa do rDNA 16S e uma caracterização fenotípica detalhada.

5. Conclusão

O principal objectivo deste trabalho era a caracterização da comunidade endofítica de *Halimione portulacoides* e o estudo de seu potencial biotecnológico. A partir dos resultados obtidos podem ser retiradas algumas conclusões:

- 1) A comunidade endofítica de *Halimione portulacoides* tem um elevado potencial biotecnológico, que deverá ser estudado com maior detalhe de forma a determinar qual a sua importância efectiva.
- 2) Uma colecção de culturas de isolados bacterianos foi estabelecida, compreendendo uma elevada diversidade (isolados pertencentes a 16 géneros distintos). Alguns destes provavelmente representam taxa ainda não descritos.

6. Perspectivas futuras

Estudos mais aprofundados são necessários, nomeadamente em relação ao potencial biotecnológico de *Halimione portulacoides*. Esta planta tem a capacidade de acumular diversos metais pesados nos seus tecidos, em quantidades consideráveis. Será importante determinar o papel que a sua comunidade endofítica desempenha nesta acumulação e eventualmente, de que forma interage com a planta no sentido de a proteger contra os efeitos nocivos dos metais pesados.

A colecção de isolados estabelecida pode e certamente será alvo de diversos estudos. Será necessário aprofundar a caracterização de alguns isolados cuja análise apontou para a possibilidade de se tratar de novas espécies ou géneros.

De forma a complementar o estudo já feito, poderá ser importante a caracterização dos isolados relativamente à resistência a antibióticos e a metais pesados. Este aspecto a

desenvolver será de elevada importância tendo em conta os estudos já desenvolvidos que apontam para a existência de elevadas concentrações de metais pesados na área em estudo, particularmente elevados teores de mercúrio, acumulados no sedimento, resultantes de décadas de poluição. Um maior conhecimento dos isolados aqui identificados poderá ser relevante para a sua utilização futura na bioremediação de habitats igualmente poluídos.

No sentido de aprofundar o conhecimento acerca do potencial biotecnológico dos isolados será importante conhecer mais aprofundadamente as enzimas extracelulares produzidas pelos mesmos, bem como averiguar a ocorrência de produção de outros metabolitos secundários não avaliados neste estudo (e.g. antimicrobianos).

Tendo em conta os resultados obtidos no presente estudo, a análise da comunidade endofítica deverá estender-se a outras plantas de sapal ainda não estudadas, bem como a outros tipos de endófitos, nomeadamente fungos.

4. Bibliografia

Adam, P. 1993. *Saltmarsh ecology*. Cambridge University Press. 461 pp.

Altschul, S., Madden, T.L., Schaeffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W. e Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acides Research*. **25** 3389-3402.

Alves, A., Henriques, I., Santos, A., Tacão, A. e Correia, A. 2003. Tipagem Genética de Microrganismos. Universidade de Aveiro. 27pp.

Andreote, F.D., Araujo, W.L., Azevedo, J.L., Elsas, J.D., Rocha, U.N. e Overbeek, L.S. 2009. Endophytic colonization of potato (*solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and the effect on associated bacterial communities. *Applied Environmental Microbiology*. **75(11)**: 3396-3406

Assumpção, L.C., Lacava, P.T., Dias, A.C.F., Azevedo, J.L. e Menten,, J.O.M. 2009. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **44(5)**: 503-510.

Azevedo, J.L. Microrganismos endofíticos. *In*: Melo, I.S., Azevedo, J.L. 1998. Ecologia Microbiana. Editora Embrapa. São Paulo. 117-137.

Barretti, P.B., Souza, R.M. e Pozza, E.A. 2008. Bactérias endofíticas como agentes produtores do crescimentos de plantas de tomateiro e de inibição in vitro de *Ralstonia solanacearum*. *Ciência e Agrotecnologia*. **32(3)**: 731-739.

Bacon, C.W., Glenn, A.E. e Hinton, D.M. Isolation, In Planta Detection, and Culture of Endophytic Bacteria and Fungi. *In: Knudsen, G. Manual of Environmental Microbiology*. 2002. American Society for Microbiology. Washington. 543-550

Baldotto, L. E., Olivares, F. L. e Smith, R. B. 2010. Strutral Interaction Between GFP-Labeled Diazotrophic Endophytic Bacterium *Herbaspirillum seredicae* RAM10 and Pineapple Plantlets 'Vitória'. *Brazilian Journal of Microbiology*. **42** 114-125

Beatty, P.H. e Jensen, S.E. 2002. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotic active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. *Canadian Journal of Microbiology*. 48: 159-169.

Caçador, I., Vale, C. e Catarino, F. 1996. The influence of plants on concentration and fractionation of Zn, Pb, and Cu in salt marsh sediments (Tagus Estuary, Portugal). *Journal of Aquatic Ecosystem Health*. 5(3): 193-198.

Carvalho, P.N, Basto, M.C.P., Silva, F.G.M., Machado, A., Bordalo, A.A. e Vasconcelos, M.T.S.D. 2010. Ability of salt marsh plants for TBT remediation. *Environmental Science Pollution Research*. **17**: 1279-1286.

Castillo, U., Harper J.K., Strobel, G.A., Sears, J., Alesi, K., Ford, E., Lin, J., Hunter, M., Maranta, M., Ge, H., Yaver, D., Jensen, J.B., Porter, H., Robinson, R., Millar, D., Hess, W.M., Condrón, M. e Teplow, D. 2003. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiology Letters*. **224(2)**: 183-190.

Castro, R., Pereira, S., Lima, A., Corticeiro, S., Válega, M., Pereira, E., Duarte, A. e Figueira, E. 2009. Accumulation, distribution and cellular partitioning of mercury in several halophytes of a contaminated salt-marsh. *Chemosphere*. **76**: 1348-1355

Choi, Y. W., Hodgkiss, I. J. e Hyde, K. D. 2005. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology*. **1** 55-66

Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K. e Lim, Y.M. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **57**: 2259-2261

Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clement, C., e Ait Barka, E. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied Environmental Microbiology*. **71** 1685-1693

Conn, V. M. e Franco, C.M.M. 2004. Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. *Applied and Environmental Microbiology*. **70(3)**: 1787-1794.

Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H. e Minamisawa, K. 2001. Endophytic Colonization and In Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species. *Applied and environmental Microbiology*. **67(11)**: 5285-5293.

Ezra, D. Castillo, U.F., Strobel, G.A., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Condrón, M., Teplow, D., Sears, J., Maranta, M., Hunter, M., Weber, W. e Yaver, D. 2004. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology*. **150**: 785-793.

Granér, G., Persson, P., Meijer, J. e Alstro, S. 2003. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. *FEMS Microbiology Letters*. **224**: 269-276.

Guan, S.H., Sattler, I., Lin, W.H., Guo, D.A. e Grabley, S. 2005. p-Aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte: *Streptomyces griseus* subspecies. *Journal of Natural Products*. **68(8)**: 1198-1200

Guo, L. D., Hyde, K. D. e Petrini, O. 1998. A method to promote sporulation in Palm endophytic fungi. *Fungal diversity* **1** 109-113

Guo, B., Dai, J.R., Huang, Y., Leong, C., Ong, W. e Carte, B.K. 2000. Cytonic acids A and B: Novel Tridepside Inhibitors of hCMV Protease from the Endophytic Fungus *Cytospora* Species. *Journal of Natural Products*. **63(5)**: 602-604

Hallmann, J., Quadts-Hallmann, A., Mahaffee, W. F. e Kloepper, J. W. 1997 Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. **43** 895-914

Janda, J.M. e Abbott, S.L. 2007. 16SRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. **Sept.** 2761-2764

Kovtunovych, G., Lar, O., Kamalova, S., Kordyum, V., Kleiner, D., e Kozyrovska, N. 1999. Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN 13 to penetrate into plant tissues. *Plant Soil*. **215** 1-6

Lacava, P.T., Andreote, F.D., Araújo, W.L. e Azevedo, J.L. 2006. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **41(4)**: 637-642.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson T.J. e Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2. *Bioinformatics*. **23(21)** 2947-2948

Li, J., Beatty, P.K., Shah, S. e Jensen, S.E. Use of PCR-Targeted Mutagenesis To Disrupt Production of Fusaricidin-Type Antifungal Antibiotics in *Paenibacillus polymyxa*. *Applied Environmental Microbiology*. **73**: 3480-3489.

Mendes, R., Pizzirani-Kleiner. A.A., Araújo, W.L. e Raaijmakers. 2007. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of Burkholderia cepacia Complex Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. **73(22)**: 7259-7267.

Miller, C.M., Miller, R.V., Garton-Kenny, D., Redgrave, B., Sears, J., Condon, M.M., Teplow, D.B. e Strobel, G.A. 1998. Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas virridiflava*. *Journal of Applied Microbiology*. **84**: 937-944.

Misaghi, I.J. e Donndelinger, C.R. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*. **80**: 808-811

Palleroni, N. J. 2010. The *Pseudomonas* Story. *Environmental Microbiology*. **12(6)** 1377-1383

Pinto, L.D. 2003. Atividade Antimicrobiana e Caracterização Molecular de Microrganismos Endofíticos Isolados de Folhas de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco). Universidade Federal de Pernambuco. 75pp.

Rainbow, P.S. 1995. Biomonitoring of Heavy Metal Availability in the Marine Environment. *Marine Pollution Bulletin*. **31(4)**: 183-192.

Reboreda, R. e Caçador, I. 2007. Copper, zinc and lead speciation in salt marsh sediments colonised by *Halimione portulacoides* and *Spartina maritima*. *Chemosphere*. **69**: 1655-1661.

Rosenblueth, M. e Martinez-Romero, E. 2006. Bacterial Endophytes and their interaction with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **19(8)**: 827-837

Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. e Dowling, D.N. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FMES Microbiology Letters*. **278**: 1-9

Seghers, D., Wittebolle, L. Top, E.M., Verstraete, W. e Siciliano, S. 2003. Impact of Agricultural Practices on the *Zea mays* L. Endophytic Community. *Applied and Environmental Microbiology*. **70(3)**: 1475-1482.

Silva, M.H.A. 2000. Aspectos morfológicos e ecofisiológicos de algumas halófitas do sapal da Ria de Aveiro. Universidade de Aveiro. 191pp.

Souza, A.Q.L., Souza, A.D.L., Astolfi Filho, S., Pinheiro, M.L.B., Sarquis, M.I.M e Pereira, J.O. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*. **34(2)**: 185-195.

Strobel, G.A., Stierle, A., Stierle, D. e Hess, W.M. 1993. *Taxomyces andreanae* a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew. *Mycotaxon*. **47**:71-78.

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. e Harper, J. 2004. Natural Products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. **67**:257-268.

Surette, M. A., Sturz, A. V., Lada, R. R. e Nowak, J. 2002. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. sativus): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and Soil*. **253** 381-390

Taghavi, S., Barac, T., Greenberg, B., Borremans, B., Vangronsvelt, J. e Lelie, D. 2005. Horizontal Gene Transfer to Endogenous endophytic Bacteria from Poplar Improves Phytoremediation of Toluene. *Applied and Environmental Microbiology*. **71(12)**: 8500-8505.

Válega, M., Lillebø, A.I., Pereira, M.E., Caçador, I., Duarte, A.C. e Pardal, M.A. 2008. Mercury in salt marshes ecosystems: *Halimione portulacoides* as biomonitor. *Chemosphere*. **73**: 1224-1229.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. e Miller, W. 2000. A greedy study for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. **7**:203-214.

Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczmarski, D. Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G. e Vidaver, A.K. 2002. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. **68(5)**: 2198-2208.

Anexo 1

Tabela V.1: Listagem dos primers utilizados neste trabalho.

Primer	Sequência	Alvo
ERIC1R	5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3'	ERIC
ERIC2	5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'	ERIC
27F	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	16S rRNA
1492R	5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	16S rRNA